



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월29일

(11) 등록번호 10-2668891

(24) 등록일자 2024년05월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) **A61K 35/17** (2015.01)
A61K 35/545 (2015.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 35/17 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2019-7033869
- (22) 출원일자(국제) 2018년04월18일
 심사청구일자 2021년04월16일
- (85) 번역문제출일자 2019년11월15일
- (65) 공개번호 10-2019-0141190
- (43) 공개일자 2019년12월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/028133
- (87) 국제공개번호 WO 2018/195175
 국제공개일자 2018년10월25일
- (30) 우선권주장
 62/486,875 2017년04월18일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20120009676 A1
 Natture Biotechnology. 2013, 31:928-933.
 US20100279403 A1

- (73) 특허권자
 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드
 미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 유니버시티 리서치 파크
- (72) 발명자
 보디아닉 막심 에이.
 미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드
- 장 신
 미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 장훈

전체 청구항 수 : 총 15 항

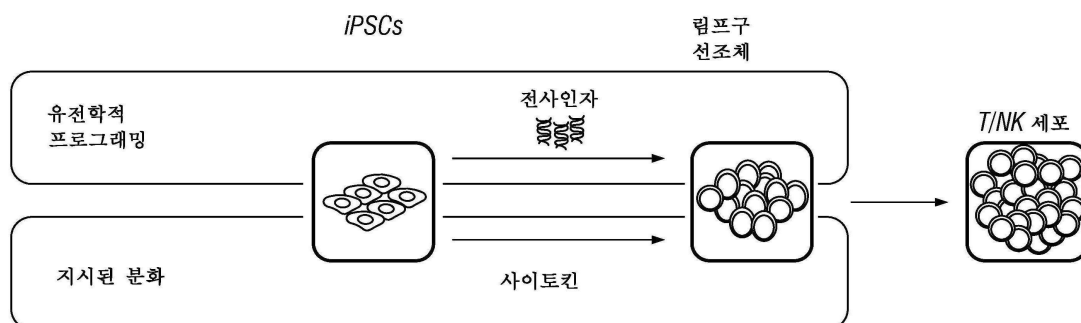
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 항원-특이적 면역 이펙터 세포

(57) 요약

본원에서는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하는 만능 줄기 세포로부터 항원-특이적 이펙터 T 세포 및 NK 세포를 생성시키는 방법이 제공된다. 본원에서는 본원에서 제공된 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 투여함에 의해 입양 세포 치료요법을 위한 방법이 추가로 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/545 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 5/0646 (2023.05)
C12N 5/0696 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)

(72) 발명자

브란들 앤드류 제이.

미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드

라제슈 디피카

미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드

스완슨 브래들리

미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드

뎀 크리스티

미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드

버튼 사라

미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드

왕 웬 보

미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드

맥러드 에단

미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드

명세서

청구범위

청구항 1

항원-특이적 이펙터(effector) T 세포 및/또는 NK 세포를 생성하는 방법으로서, 상기 방법이

(a) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 만능 줄기 세포 (PSC)를 가공하여 CAR-PSC를 생성하는 단계;

(b) 상기 CAR-PSC를 $CD34^+$ 조혈 선조체 세포 (hematopoietic progenitor cell; HPC)로 분화시키는 단계;

(c) 상기 $CD34^+$ HPC를 T 세포 및/또는 NK 세포로 추가로 분화시키는 단계; 및

(d) 상기 T 세포 및/또는 NK 세포를 확장시켜 항원-특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성하되, 여기서, 상기 확장이 항원-특이적 표적 세포와 동시 배양함을 포함하는 단계

를 포함하고,

여기서, 단계 (b)가

(ba) 블레비스타틴 (blebbistatin), GSK-3 억제제, FGF2 및 VEGF의 존재하에 배아체(EB)를 생성하는 단계;

(bb) 상기 EB를 BMP-4, VEGF, 및 FGF2와 접촉시켜 중배엽 유도를 유도하는 단계; 및

(bc) 상기 EB를 Flt-3 리간드, IL3, SCF 및 TPO의 존재하에 분화시켜 HPC를 생성하는 단계

를 포함하는 유도 분화(directed differentiation)를 수행함을 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (a)의 상기 PSC가 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC) 또는 배아 줄기 세포 (ESC)이고, 상기 iPSC가 T 세포로부터 재프로그래밍되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (bc)의 분화가, BMP4가 부재이거나; 또는 단계 (bc)의 분화가 IL-11, cAMP 및 VEGF로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 존재를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 GSK-3 억제제가 CHIR99021인, 방법.

청구항 5

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PSC가 전이유전자 부재이고 사람-유래 세포인, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 T 세포가 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, 세포독성 T 세포, 조절 T 세포, 천연 킬러 T 세포, 순수 (naive) T 세포, 기억 T 세포 또는 감마 델타 T 세포인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 단계 (a)의 상기 PSC가 추가로 가공되어 단일 유도성 프로모터의 제어하에 ERG/ETV2, GATA2 및 HOXA9를 발현하고/하거나 추가로 가공되어 HMG2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 및 HOXA4 중 하나 이상을 발현하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 방법이 한정된 피더(feeder) 부재 조건하에서 세포를 배양함을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

단계 (b)가 항원-특이적 T 세포 및/또는 NK 세포로의 분화 전에 CD34 및 CD43을 발현하는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함하고,

상기 선택이 자기-활성화된 세포 분류 (magnetic-activated cell sorting; MACS)를 수행하는 단계를 포함하거나;

CD34 및 CD43을 발현하는 상기 세포가 총 세포 집단의 적어도 35 퍼센트를 차지하거나;

CD34 및 CD43을 발현하는 상기 세포가 총 세포 집단의 적어도 65 퍼센트를 차지하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 HPC의 적어도 5 퍼센트가 상기 CAR을 발현하거나;

상기 HPC의 적어도 10 퍼센트가 상기 CAR을 발현하거나;

상기 HPC의 적어도 15 퍼센트가 상기 CAR을 발현하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

단계 (c)의 분화가 저산소 조건하에 아스코르브산 및 니코틴아미드의 존재하에 레트로벡틴 및 노치 (Notch) DLL-4 코팅된 표면 상에 상기 HPC를 배양하는 단계를 포함하고,

상기 배양이 SCF, FLT-3 리간드, TPO 및 IL7을 추가로 포함하거나; 또는 상기 배양이 GSK-3 억제제, IL-2 및 IL-12로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 추가로 포함하거나;

상기 분화된 $CD34^+$ HPC의 적어도 1.5 퍼센트가 $CD3^+CAR^+$ T 세포이거나;

상기 분화된 $CD34^+$ HPC의 적어도 2퍼센트가 $CD3^+CAR^+$ NK 세포이거나;

상기 확장된 $CD34^+$ HPC의 적어도 10퍼센트가 $CD3^+CAR^+$ NK 세포인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

단계 (d)의 확장이 항-CD3 항체, IL-2 및 IL-15의 존재하에 항원-특이적 T 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 확장된 $CD34^+$ HPC의 적어도 2 퍼센트가 $CD3^+CAR^+$ T 세포이거나;

단계 (d)의 확장이 항-CD3 항체, IL-2, IL-15 및 IL-21의 존재하에 항원-특이적 T 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하거나;

단계 (d)의 확장이 항-CD3 항체, FLT3-리간드, IL-7, IL-2, IL-15 및/또는 IL-21의 존재하에 항원-특이적 T 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하거나;

단계 (d)의 확장이 SCF 및 TPO로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 또는 2개의 추가의 성분들을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 CAR 및 상기 항원-특이적 표적 세포가 동일한 항원에 대한 것이고, 상기 항원이 CD19이거나;

상기 항원-특이적 표적 세포가 종양 세포이거나;

상기 항원-특이적 표적 세포가 사람-유래 세포이고;

상기 항원-특이적 표적 세포가 HLA 부류 I 음성이고, 상기 항원-특이적 이펙터 T 세포의 적어도 5 퍼센트가 표적 세포에 대해 세포독성 활성을 나타내거나, 상기 항원-특이적 이펙터 NK 세포의 적어도 40 퍼센트가 표적 세포에 대해 세포독성 활성을 나타내는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 CAR이 상기 PSC의 게놈으로 통합된 DNA에 의해 암호화되거나;

상기 CAR이 세포내 신호전달 도메인, 막관통 도메인, 및 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함하거나;

상기 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ 및 CD28을 포함하거나, 상기 항원 결합 영역이 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 또는 scFv인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 PSC가 HLA 동종접합성이고,

상기 HLA 동종접합성 PSC가 유전자좌 대립유전자 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP 또는 HLA-DQ 중 하나 이상에 대해 동종접합성이거나;

상기 HLA 동종접합성 PSC가 유전자좌 대립유전자 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP 또는 HLA-DQ 중 2개에 대해 동종접합성이거나;

상기 HLA 동종접합성 PSC가 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C에 대해 동종접합성인, 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2017년 4월 18일자로 출원된 미국 가출원 번호 제62/486,875호의 우선권을 주장하며, 이의 내용 전체는 본원에 참고로 인용된다.

[0002] 1. 기술분야

[0003] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 T 세포 및 NK 세포와 같은 항원-특이적 면역 이펙터 세포에 관한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 2. 관련 기술에 대한 설명

[0005] 암으로 진단된 환자에게 가용한 진단 및 치료 옵션에서의 기술적 진보에도 불구하고, 예후는 여전히 불량한 상태로 남아있고 많은 환자들이 치유될 수 없다. 면역치료요법은 다양한 종양을 갖는 것으로 진단된 환자들에게 강력하지만 표적화된 치료를 제공하기 위해 유망하고 정상 조직을 손상시키는 것 없이 악성 종양 세포를 박멸시킨다. 이론적으로, 면역계의 T 세포는 종양 세포에 특이적인 단백질 패턴을 인지할 수 있고 다양한 이펙터 기전을 통해 이들의 파괴를 매개할 수 있다. 입양 T 세포 치료요법은 환자 자신의 T 세포의 종양-박멸 능력을 이용하여 이를 증폭시키고 이어서 이들이 잔여 종양을 효과적으로 제거하지만 건강한 조직을 손상시키지 않는 상태로 환자에게 복귀시키기 위한 시도이다. 상기 근접법이 종양 면역학 분야에서 새롭게 없지만, 입양 T 세포 치료요법의 임상적 용도에서 많은 결점은 암 치료에서 상기 근접법의 완전한 사용을 손상시킨다.

[0006] 현재 입양 T 세포 치료요법은 체내 이들의 회귀성, 다수의 종양 면역계 회피 기전을 극복하기 위한 실패 및 이들의 짧은 수명을 포함하는, 환자 및 종양-특이적 T 세포의 부재에 의해 제한된다. 전형적으로 목적하는 항원에 반응하는 낮은 수의 T 세포를 단리하고 확장하는 것이 난제이다. 따라서, 면역치료요법에서 효과적인 사용을 위해 치료학적으로 충분하고 기능적인 항원-특이적 면역 세포에 대한 필요성이 충족되지 않고 있다.

발명의 내용

[0007] 발명의 개요

[0008] 제1 구현예에서, 본원의 개시내용은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 만능 줄기 세포 (PSC)를 가공함으로써 CAR-PSC를 생성하고; 상기 CAR-PSC를 $CD34^{+}$ 조혈 선조 세포 (HPC)로 분화시키거나 정방향 재프로그래밍하고; 추가로 상기 $CD34^{+}$ HPC를 T 세포 및/또는 NK 세포로 분화시키고; 상기 T 세포 및/또는 NK 세포를 확장시킴을 포함하는 항원-특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성시키는 방법을 제공한다. 일부 양상에서, 확장은 항원-특이적 표적 세포와 동시 배양함으로써 항원-특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성함을 포함한다.

[0009] 특정 양상에서, CAR을 발현하도록 가공된 PSC는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC) 또는 배아 줄기 세포 (ESC)이다. 특정 양상에서, iPSC는 체세포, 예를 들어, T 세포로부터 재프로그래밍된다.

[0010] 일부 양상에서, CAR-PSC를 $CD34^{+}$ HPC로 분화시키는 단계는 지시된(directed) 분화를 수행함을 포함한다. 특정 양상에서, 지시된 분화는 블레비스타틴(blebbistatin), GSK-3 억제제, FGF2, 및 VEGF의 존재하에 배아체 (EB)를 생성하고; EB를 BMP4, VEGF, 및 FGF2와 접촉시켜 중배엽 유도를 유도하고; Flt-3 리간드, IL-3, SCF, 및 TPO의 존재하에 상기 EB를 분화시킴으로써, HPC를 생성함을 포함한다. 일부 양상에서, 상기 분화는 BMP4가 필수적으로 부재이거나 부재인 배지에서 일어난다. 다른 양상에서, 상기 분화는 BMP4의 존재하에 일어난다. 특정 양상에서, 상기 GSK-3 억제제는 CHIR99021이다. 일부 양상에서, 분화는 IL-11, cAMP, 및/또는 VEGF의 존재를 추가로 포함한다.

[0011] 일부 양상에서, 지시된 분화는 아민-코팅된 표면 상의 개별화된 PSC를 블레비스타틴, BMP4, VEGF, 및 bFGF의 존재하에 배양하고; PSC를 BMP4, VEGF, 및 FGF2와 접촉시킴에 의해 분화를 개시하고; 상기 PSC를 Flt-3 리간드, IL-3, IL-6, SCF, TPO, 및 헤파린의 존재하에 추가로 분화시킴으로써 HPC를 생성함을 포함하고, 여기서, 상기 방법은 EB의 형성을 포함하지 않는다.

[0012] 특정 양상에서, 상기 방법은 한정된 피더(feeder) 부재 조건하에, 예를 들어, 전체 방법의 지속기간 동안 세포를 배양함을 포함한다. 일부 양상에서, PSC는 필수적으로 전이유전자 부재이거나 전이유전자 부재이다. 특정 양상에서, PSC는 사람이다. 특정 양상에서, T 세포는 $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, 세포독성 T 세포, 조절 T 세포, 천연 킬러 T 세포, 순수 T 세포, 기억 T 세포, 및/또는 감마 델타 T 세포이다.

[0013] 특정 양상에서, CAR을 발현하도록 가공된 PSC는 추가로 가공하여 예를 들어, 단일 유도성 프로모터의 제어하에 ERG/ETV2, GATA2, 및 HOXA9를 발현한다. 일부 양상에서, 상기 방법은 PSC를 추가로 가공하여 HMG2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1, 및/또는 HOXA4를 발현한다. 따라서, 일부 양상에서, CAR-PSC를 $CD34^{+}$ HPC로 분화시키는 단계는 HPC를 생산하기 위해 충분한 기간 동안 ERG/ETV2, GATA2, 및 HOXA9의 발현을 유도하고 HPC의 T 세포 및/또는 NK 세포로 추가로 분화시키기 전 발현의 유도를 종결시킴을 포함한다.

[0014] 특정 양상에서, CAR-PSC를 $CD34^{+}$ HPC로 분화시키는 단계는 추가로 항원-특이적 T 세포 및/또는 NK 세포로의 분화 전에 $CD34$ 및/또는 $CD43$ 을 발현하는 세포를 선택함을 포함한다. 특정 양상에서, 선택은 자기 활성화된 세포 분류 (MACS)를 수행함을 포함한다. 일부 양상에서, $CD34$ 및/또는 $CD43$ 을 발현하는 세포는 총 세포 집단의 적어도 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% 이상을 포함한다. 일부 양상에서, $CD34$ 및/또는 $CD43$ 양성 세포를 선택하기 위해 MAC를 수행하는 단계는 수행되지 않는다.

[0015] 특정 양상에서, HPC의 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 퍼센트 이상은 CAR을 발현한다. 일부 양상에서, HPC의 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 퍼센트 이상은 CAR을 발현한다.

[0016] 일부 양상에서, HPC의 T 세포 및/또는 NK 세포로의 분화는 저산소증 조건하에 아스코르브산 및 니코틴아미드의 존재하에 레트로벡틴 및 노치(Notch) DLL-4 코팅된 표면 상에 HPC를 배양함을 포함한다. 일부 양상에서, 상기 배양은 추가로 SCF, FLT-3 리간드, TPO, 및 IL-7를 포함하고, 임의로 GSK 억제제 (예를 들어, CHIR99021), IL-2, 및/또는 IL-12을 포함한다. 특정 양상에서, 상기 확장 단계는 추가로 항-CD3 항체 및 IL-2의 존재하에 항원-특이적 T 세포를 배양함을 포함한다. 추가의 양상에서, 상기 확장 단계는 추가로 항-CD3 항체, IL-2, IL-15, 및 IL-21의 존재하에 항원-특이적 T 세포를 배양함을 포함한다. 일부 양상에서, 상기 확장 단계는 항-CD3 항체,

FLT3-리간드, IL-7, IL-2, 및/또는 IL-15의 존재하에 상기 항원 특이적 T 세포를 배양함을 포함하고 임의로 추가로 SCF, TPO, 및/또는 IL-21을 포함한다. 특정 양상에서, 분화된 $CD34^{+}$ HPC의 적어도 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 퍼센트 이상은 $CD3^{+}CAR^{+}$ T 세포이다. 일부 양상에서, 분화된 $CD34^{+}$ HPC의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50퍼센트 이상은 $CD3^{+}CAR^{+}$ NK 세포이다. 일부 양상에서, 확장된 $CD34^{+}$ HPC의 적어도 2퍼센트는 $CD3^{+}CAR^{+}$ T 세포이다. 특정 양상에서, 확장된 $CD34^{+}$ HPC의 적어도 10퍼센트는 $CD3^{+}CAR^{+}$ NK 세포이다.

[0017] 특정 양상에서, CAR 및 항원 특이적 표적 세포는 동일한 항원으로 지시된다. 하나의 특이적 양상에서, 상기 항원은 CD19이다. 특정 양상에서, 상기 항원 특이적 표적 세포는 종양 세포이다. 일부 양상에서, 항원-특이적 표적 세포는 사람이다. 특정 양상에서, 항원 특이적 표적 세포는 HLA 부류 I 음성이다. 일부 양상에서, 항원 특이적 이펙터 T 세포의 적어도 5, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50퍼센트 이상은 표적 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸다. 특정 양상에서, 항원 특이적 이펙터 NK 세포의 적어도 10, 예를 들어, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50퍼센트 이상은 표적 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸다.

[0018] 일부 양상에서, CAR은 PSC의 게놈으로 통합된 DNA에 의해 암호화되어 있다. 특정 양상에서, CAR은 세포내 신호 전달 도메인, 막관통 도메인, 및 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 세포내 신호전달 도메인은 $CD3\zeta$ 및 CD28을 포함한다. 일부 양상에서, 항원 결합 영역은 $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, 또는 scFv이다.

[0019] 특정 양상에서, PSC는 HLA 동종접합성이다. 일부 양상에서, HLA 동종접합성 PSC는 유전자좌 대립유전자 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP 또는 HLA-DQ 중 하나 이상에 대해 동종접합성이다. 특정 양상에서, HLA 동종접합성 PSC는 유전자좌 대립유전자 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP 또는 HLA-DQ 중 2개에 대해 동종접합성이다. 특정 양상에서, HLA 동종접합성 PSC는 HLA-A 및 HLA-B에 대해 동종접합성이다. 특정 양상에서, HLA 동종접합성 PSC는 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C에 대해 동종접합성이다.

[0020] 또 다른 구현예는 PSC를, CAR을 발현하도록 가공함으로써 CAR-PSC를 생성하고; 상기 CAR-PSC를 블레비스타틴, GSK-3 억제제, FGF2, 및 VEGF의 존재하에 배양함으로써 EB를 생성하고; 상기 EB를 BMP4, VEGF, 및 FGF2와 접촉시켜 중배엽 유도를 유도하고; 상기 EB를 Flt-3 리간드, BMP4, IL-3, SCF, 및 TPO의 존재하에 분화시킴으로써, $CD34^{+}$ HPC를 생성하고; 추가로 $CD34^{+}$ HPC를 T 세포 및/또는 NK 세포로 분화시키고; T 세포 및/또는 NK 세포를 확장시킴을 포함하는, 항원-특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성하는 방법을 제공하고, 여기서, 상기 확장은 항원-특이적 표적 세포와 동시 배양하여 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성함을 포함한다. 특정 양상에서, 상기 GSK-3 억제제는 CHIR99021이다.

[0021] 또 다른 구현예에서, PSC를 CAR을 발현하도록 가공함으로써 CAR-PSC를 생성하고; 개별화된 CAR-PSC를 블레비스타틴, BMP4, VEGF의 존재하에 아민 코팅된 표면 상에서 배양하고; 상기 cAR-PSC를 BMP4, VEGF, 및 FGF2와 접촉시켜 분화를 개시하고; 상기 CAR-PSC를 Flt-3 리간드, IL-3, IL-6, SCF, TPO, 및 헤파린의 존재하에 추가로 분화시킴으로써, $CD34^{+}$ HPC를 생성하고; 상기 $CD34^{+}$ HPC를 T 세포 및/또는 NK 세포로 분화시키고; T 세포 및/또는 NK 세포를 확장시킴을 포함하는, 항원-특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성하는 방법이 제공되고, 여기서, 상기 확장은 항원-특이적 표적 세포와 동시 배양하여 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성함을 포함하고, 상기 방법은 EB의 형성을 포함하지 않는다.

[0022] 추가의 구현예는 CAR을 발현하도록 PSC를 가공함으로써 CAR-PSC를 생성하고; CAR-PSC를 $CD34^{+}$ HPC로 분화시키고; $CD34^{+}CD43^{+}$ HPC를 선택하고; $CD34^{+}CD43^{+}$ HPC를 T 세포 및/또는 NK 세포로 추가로 분화시키고; 상기 T 세포 및/또는 NK 세포를 확장시킴을 포함하는 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성하는 방법을 제공하고, 여기서, 상기 확장은 항원 특이적 표적 세포와 동시 배양함으로써 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성함을 포함한다.

[0023] 또 다른 구현예에서, 상기된 구현예에 따라 생성된 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포 집단이 제공된다. 또한 본원에서, 본원에 기재된 구현예에 따라 생성된 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 또한 본원에서, 대상체에서 암의 치료를 위한 구현예에 따라 생성된 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 또한 본원에서, 암의 치료를 위한 구현예에

따라 생성된 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포의 용도가 제공된다.

[0024] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 구현예에 따라 생성된 항원-특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포의 유효량을 대상체에게 투여함을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 양상에서, 상기 암은 중앙 항원을 발현하고 항원 특이적 이펙터 T 세포 및/또는 NK 세포는 상기 중앙 항원으로 지시된다. 특정 양상에서, 대상체는 사람이다.

[0025] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점들은 하기의 상세한 설명을 보면 명백해 질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 본 발명의 바람직한 실시양태를 제시하는 구체적인 실시예는, 상기 상세한 설명으로부터 본 발명의 개념과 범위 내에서 다양한 변화 및 변형을 줄 수 있음이 당업계의 숙련자에게는 명백하기 때문에, 단지 예시로서만 제공되는 것임을 알아야 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 하기의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 양상을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제공된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조로 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1a-1g: (도 1a) 정방향 프로그래밍 방법 및 지시된 분화 방법을 포함하는, PSC로부터 T 세포 및 NK 세포를 생성하기 위한 방법을 도시하는 도식. (도 1b) hPSC의 피더 부재 및 무혈청 T 및 NK 세포 분화를 나타내는 도식. 약어: CHIR - CHIR99021 GSK-3 억제제; HDM, 무혈청 조혈 분화 배지; TCDM, T 세포 분화 배지; TCEM, T 세포 확장 배지; HPC, 조혈 선조체 세포; 표시된 별표 (*)는 임의의 증진 성분들이다. (도 1c) 지시된 분화 또는 정방향 프로그래밍을 통한 PSC 기원의 CD34⁺CD43⁺ HPC의 효능. (도 1d) T/NK 분화 배양물의 유동 세포측정 분석. (도 1e) 분화 전반에 걸쳐 상이한 세포 집단의 수율. (도 1f) PSC-유래된 T 세포의 표현형. (도 1g) PSC-유래된 T 세포의 확장. 고정화된 항-CD3 항체(iCD3)는 PSC 유래된 T 세포 (막대 그래프)의 확장을 위한 것이다. 확장 배양물에서 T 세포 증식은 불규칙 형상의 림프아구의 특징적인 형태를 획득한다(사진). CD56은 2주 T 세포 확장의 CD8 발현을 획득한다(유동 세포측정 도트 플롯).

도 2: PSC-유래된 T/NK 세포에서 CAR 발현. 단백질 L 염색을 사용한 유동 세포측정에 의해 평가된 분화 단계 전반에 걸친 CAR 발현. CD3⁺ T 세포는 람다 쇠 마우스 항-사람 CD3 mAb (클론 SP34-2)로 동시 염색하였다. E11 PSC 및 E11-유래된 HPC 및 T 세포에 의한 CAR 발현을 나타낸다.

도 3a-b: PSC 유래된 T/NK 세포에서 시험관내 항-CD19 CAR-매개된 세포독성. (도 3a) 루시퍼라제-발현 CD19⁺ 다우디 (Daudi) 및 라지(Raji) 표적 세포를 사용한 시험관내 세포독성 검정. (도 3b) Incucyte S3 생세포 분석 시스템(Essen Bioscience)을 사용한 실시간 표적 세포 계수에 의한 CAR-T 세포의 세포용해 잠재력.

도 4: PSC 유래된 T/NK 세포에서 시험관내 항-CD19 CAR-유도된 사이토킨 생성.

도 5a-5b: PSC-유래된 CAR-T/NK 세포의 생체내 암용해(oncolytic) 잠재력. (도 5a) 생체내 생발광 이미지화에 의해 모니터링되는 마우스 내 종양 진행. (도 5b) PSC-유래된 T (1C) 또는 NK (A16) 세포로 처리된 마우스의 상이한 그룹에서 생존률 곡선.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 본원에서 CAR-PSC로서 언급되는 키메라 항원 수용체 (CAR)와 같은 항원 수용체를 발현하도록 가공된 사람 만능 줄기 세포 (PSC)로부터 항원 특이적 면역 이펙터 세포를 생성하기 위한 고도로 효율적인 방법을 제공한다. 현재 방법에 의해 생성된 면역 이펙터 세포는 T 세포, NK 세포 및 iNKT 세포를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0028] PSC는 T 세포 유래된 iPSC(TiPSC)를 생성하도록 T 세포의 개시 집단을 재프로그래밍함에 의해 (예를 들어, 레트로바이러스 또는 에피솜 방법에 의해) 수득될 수 있다. 상기 T 세포는 혈액 샘플과 같은 다양한 공급원으로부터 단리될 수 있다. T 세포의 개시 집단은 이들의 특징적인 T 세포 수용체 (TCR) 유전자 재배열을 보유할 수 있고 HLA 동종접합성 세포 (즉, MHC 부류 I 및 II 유전자에 대해 동종접합성인)일 수 있다. 따라서, iPSC는 본원에서 HLA 슈퍼 공여자로서 언급된, HLA 동종접합성 대상체로부터 단리된 세포로부터 생성될 수 있다.

[0029] CAR-PSC는 이어서 CD34⁺ 조혈 선조체 세포 (HPC)를 생성하도록 분화되거나 프로그래밍될 수 있다. 이것은 사이토킨 (예를 들어, SCF, TPO, FLT-3, IL-6, IL-3, 및 헤파린)의 조합을 사용한 지시된 분화(예를 들어, 이의 전

문이 참조로 인용되는 PCT/US2016/057899에 기재된)를 통해 성취될 수 있다. 또 다른 방법에서, CAR-PSC는 ETV2/ERG, GATA2, 및 HOXA9를 암호화하는 발현 작제물 (즉, EGH) (예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 PCT/US2016/057893에 기재된)과 함께 정방향 프로그래밍을 사용하여 CD34⁺ HPC로 분화될 수 있다. 이들 EGH-PSC는 추가로 장기간 이식능을 위해 HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1, 및/또는 HOXA4를 발현하도록 가공될 수 있다.

[0030] 최종적으로, 상기 CD34⁺ CAR-HPC는 CD3⁺ T 세포 또는 CD56⁺CD3⁻ NK 세포로 분화될 수 있다. 림프구 잠재력을 위한 HPC 분화동안에 최적의 시간 프레임(예를 들어, 7 내지 11일)은 CD34 및 CD43의 발현에 의해 동정된 7 내지 11일 수 있다. 예를 들어, 증진된 림프구 잠재력을 갖는 HPC는 마커 CD144, CD34, CD45, 및 CD7 중 2개 이상에 대해 양성인 세포의 분획을 분류함에 의해 단리될 수 있다.

[0031] T 세포 분화를 위한 예시적 방법은 피더 부재 매트릭스로서 레트로벡틴 및 DLL-4의 용도를 포함한다. T 세포 분화는 추가로 효율 및 성숙화를 증가시키기 위한 아스코르브산의 사용에 의해 그리고 저산소 조건하에서 배양함에 의해 증진될 수 있다.

[0032] 추가로, T 세포 및/또는 NK 세포는 분화 공정 동안에 항원 특이적 표적 세포 (예를 들어, 종양 세포)와 동시 배양함에 의해 확장될 수 있다. 상기 방법은 구체적으로 종양 성장의 감소 및 종양 세포가 주사된 마우스의 생존률의 증가에 의해 관찰되는, 표적 세포에 대한 T 세포 및 NK 세포의 세포독성 활성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0033] 따라서, 본원의 방법은 안정한 생체내 이식, 시험관내 화합물의 스크리닝 및 조혈 질환 및 손상 기전의 해명과 같은 광범위한 응용을 위해 T 세포 및 NK 세포와 같은 무제한의 항원 특이적 면역 이펙터 세포를 제공할 수 있다.

[0034] I. 정의

[0035] 본원에서, 특정 성분과 관련하여 "필수적으로 없는"이라는 말은 해당 특정 성분을 의도적으로 조성물 내로 전혀 제형화하여 첨가하지 않았고/않았거나 해당 특정 성분이 오염물로서만 존재하거나 미량으로만 존재하는 것을 의미하기 위해 사용된다. 따라서, 조성물의 의도치 않은 임의의 오염으로 야기된 특정 성분의 총량은 0.05% 미만, 바람직하게는 0.01%이다. 표준 분석 방법으로 특정 성분의 양이 검출될 수 없는 조성물이 가장 바람직하다.

[0036] 본원 명세서에서, 단수형 관사("a" 또는 "an")는 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원 청구항에서, 단수형 관사("a" 또는 "an")는 "포함하는"이라는 단어와 함께 사용되는 경우 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다.

[0037] 청구항에서 "또는"이라는 용어의 사용은, 그것이 명시적으로 대안만을 언급하지 않는 한 또는 명세서가 대안 및 "및/또는"만을 언급하는 정의를 뒷받침하고 있더라도 그 대안이 상호 배타적이지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다. 본원에서 "또 다른"이라는 용어는 적어도 두번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0038] 본 출원 전반에 걸쳐, "약"이라는 용어는 어떠한 값이 해당 장치, 그 값을 측정하는데 사용되는 방법에 대한 고유의 오차 변화, 또는 해당 연구 대상들 간에 존재하는 변화를 포함함을 나타내는데 사용된다.

[0039] 세포 또는 유기체에서 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 사용되는 경우 용어 "외인성"은 인공 또는 천연 수단에 의해 세포 또는 유기체에 도입된 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 언급하거나; 세포와 관련하여, 상기 용어는 인공 또는 천연 수단에 의해 단리되고 다른 세포로 또는 유기체로 도입된 세포를 언급한다. 외인성 핵산은 상이한 유기체 또는 세포로부터 유래할 수 있거나, 또는 상기 유기체 또는 세포 내에서 천연적으로 존재하는 핵산의 하나 이상의 추가의 카피물일 수 있다. 외인성 세포는 상이한 유기체로부터 기원할 수 있거나 이것은 동일한 유기체로부터 기원할 수 있다. 비제한적인 예로서, 외인성 핵산은 천연 세포에서와는 상이한 염색체 위치 내에 존재하거나, 그렇지 않은 경우에는 천연에서 발견되는 것과는 상이한 핵산 서열에 의해 플랜킹된다.

[0040] "발현 작제물" 또는 "발현 카세트"란 전사를 지시할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현 작제물은 하나 이상의 목적하는 세포 유형, 조직 또는 기관에서 유전자 발현을 지시하는 하나 이상의 전사 제어 요소들(예를 들어, 프로모터, 인핸서 또는 이와 구조적으로 균등한 구조물)을 포함한다. 전사 종결 신호와 같은 추가의 요소들이 또한 포함될 수 있다.

[0041] "백터" 또는 "작제물" (때로는 유전자 전달 시스템 또는 유전자 전달 "비히클"로 언급됨)은 시험관내 또는 생체내 숙주 세포로 전달될 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 거대분자 또는 분자의 복합체를 언급한다.

- [0042] 벡터의 통상적인 유형인 “플라스미드”는 염색체 DNA와는 독립적으로 복제할 수 있는 염색체 DNA로부터 분리된 염색체의 DNA 분자이다. 특정 경우에, 이것은 환형 및 이중 가닥이다.
- [0043] “복제의 오리진” (“ori”) 또는 “복제 오리진”은 세포 내 플라스미드에 존재하는 경우 플라스미드 및/또는 DNA 합성을 개시하는 곳 또는 근처 부위에서 연결된 서열을 유지할 수 있는, 예를 들어, 림프영양 헤르페스 바이러스 내 DNA 서열이다. 하나의 예로서, EBV(엡슈타인-바르 바이러스)에 대한 ori는 FR 서열 (30bp 반복체의 20개 불완전 카피물) 및 바람직하게 DS 서열을 포함하지만; EBV 내 다른 부위는 EBNA-1에 결합하고, 예를 들어, Rep* 서열은 복제의 오리진으로서 DS를 대체할 수 있다(문헌참조: Kirshmaier and Sugden, 1998). 따라서, EBV의 복제 오리진은 FR, DS 또는 Rep* 서열 또는 핵산 변형 또는 이로부터 유래된 합성 조합을 통한 임의의 기능적으로 균등한 서열을 포함한다. 예를 들어, 본원의 개시내용은 또한 예를 들어, 문헌(참조: Lindner *et al.*, 2008)에 구체적으로 기재된 바와 같이, 개별 요소들의 삽입 또는 돌연변이에 의해서와 같이 EBV의 유전학적으로 가공된 복제 오리진을 사용할 수 있다.
- [0044] 특정 단백질을 “암호화하는” “유전자”, “폴리뉴클레오타이드”, “암호화 영역”, “서열”, “분절”, “단편”, 또는 “전이유전자”는 적당한 조절 서열의 제어하에 위치되는 경우, 전사되어 임의로 또한 시험관내 또는 생체내 유전자 생성물, 예를 들어, 폴리펩타이드로 해독되는 핵산 분자이다. 상기 암호화 영역은 cDNA, 게놈 DNA 또는 RNA 형태로 존재할 수 있다. DNA의 형태로 존재하는 경우, 핵산 분자는 단일 가닥 (즉, 센스 가닥) 또는 이중 가닥일 수 있다. 암호화 영역의 경계는 5' (아미노) 말단에서 개시 코돈과 3' (카복시) 말단에서 해독 종결 코돈에 의해 결정된다. 유전자는, 이에 제한되지는 않지만, 원핵 또는 진핵 mRNA로부터의 cDNA, 원핵 또는 진핵 DNA로부터 게놈 DNA 서열, 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있다. 전사 종결 서열은 일반적으로 유전자 서열에 대하여 3' 방향으로 위치할 것이다.
- [0045] 용어 “제어 요소”는 총체적으로 프로모터 영역, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결 서열, 업스트림 조절 도메인, 복제의 오리진, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 인핸서, 스플라이스 접합부 등을 언급하고, 이들은 총체적으로 수용자 세포 내 암호화 서열의 복제, 전사, 전사 후 프로세싱 및 암호화 서열의 해독을 제공한다. 선택된 암호화 서열이 적당한 숙주 세포에서 복제되고, 전사되고 해독될 수 있는 한 이들 제어 요소들의 전부가 존재할 필요는 없다.
- [0046] “프로모터”라는 용어는 본원에서 DNA 조절 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 영역을 언급하는 통상적인 의미로 사용되며, 여기서, 상기 조절 서열은 RNA 폴리머라제에 결합하여 다운스트림 (3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 유전자로부터 유래한다. RNA 폴리머라제, 및 핵산 서열의 특정 전사를 개시하기 위한 다른 전사 인자와 같은 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전학적 요소를 함유할 수 있다. 용어 “작동적으로 위치된”, “작동적으로 연결된”, “제어 하에”, 및 “전사 제어 하에”는 프로모터가 상기 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 제어하기 위해 핵산 서열과 관련된 올바른 기능성 위치 및/또는 배향으로 있음을 의미한다.
- [0047] “인핸서”란 인핸서 도메인의 부재하에 프로모터로부터 비롯되는 전사 활성화에 비해 프로모터에 근접하게 위치되는 경우 증가된 전사 활성을 부여하는 핵산 서열을 의미한다.
- [0048] 핵산 분자와 관련하여 “작동적으로 연결된” 또는 “동시 발현된”은 2개 이상의 핵산 분자 (예를 들어, 전사될 핵산 분자, 프로모터 및 인핸서 요소)가 핵산 분자의 전사를 허용하도록 하는 방식으로 연결되어 있음을 의미한다. 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드 분자와 관련하여 “작동적으로 연결된” 또는 “동시 발현된”은 2개 이상의 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드 분자가 단일 폴리펩타이드 쇄, 즉 융합체의 각각의 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드 성분의 적어도 하나의 성질을 갖는, 융합 폴리펩타이드를 생성시키는 방식으로 연결되어 있음을 의미한다. 융합 폴리펩타이드는 바람직하게 즉, 이중성 분자들로 구성된 키메라이다.
- [0049] “상동성”은 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩타이드 간의 퍼센트 동일성을 언급한다. 하나의 서열과 또 다른 서열 간의 상동성은 당업계에 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 상동성은 서열 정보를 정렬하고 용이하게 가용한 컴퓨터 프로그램을 사용함에 의해 2개의 폴리펩타이드 분자 간의 서열 정보의 직접적인 비교에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 상동성은 상동성 영역 간의 안정한 듀플렉스의 형성을 촉진시키는 조건하에 폴리뉴클레오타이드를 하이브리드화하고 이어서 단일 가닥 특이적 뉴클레아제 (들)를 사용한 분해, 및 분해된 단편의 결정에 의해 결정될 수 있다. 2개의 DNA, 또는 2개의 폴리펩타이드 서열은 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 적어도 약 80%, 바람직하게 적어도 약 90% 및 가장 바람직하게 적어도 약 95%가 상기 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 분자의 한정된 길이를 따라 각각 일치되는 경우 서로 “실질적으로 상동성”이다.

- [0050] 용어 “세포”는 당업계에서의 가장 광범위한 의미로 본원에 사용되고 다세포 유기체의 조직의 구조적 유닛이고 외부로부터 이를 단리하는 막 구조에 의해 둘러싸여 있고 자가-복제 능력을 가지며 유전학적 정보를 갖고 이를 발현하기 위한 기전을 갖는 생체를 언급한다. 본원에서 사용된 세포는 자연 발생적인 세포 또는 인위적으로 조작된 세포 (예를 들어, 융합 세포, 유전학적으로 변형된 세포 등)일 수 있다.
- [0051] “줄기 세포”라는 용어는 본원에서 적절한 조건 하에 다양한 범위의 분화 세포형으로 분화할 수 있는 세포, 한편으로는 적절한 다른 조건 하에 자기 재생 및 필수적으로 미분화된 만능 상태로 남아 있을 수 있는 세포를 지칭한다. 또한, “줄기 세포”라는 용어는 만능 세포, 다능성 세포, 전구체 세포 및 간세포를 포괄한다. 전형적인 인간 줄기 세포는 골수 조직으로부터 수득된 조혈 또는 간엽 줄기 세포, 배아 조직으로부터 수득된 배아 줄기 세포, 또는 태아의 생식기 조직으로부터 수득된 배아 생식 세포로부터 수득될 수 있다. 또한, 전형적인 만능 줄기 세포는 다능성과 관련된 특정 전사 인자의 발현에 의해 만능 상태로 체세포를 재프로그래밍함으로써 해당 체세포로부터도 생성될 수 있고; 이들 세포들은 “유도성 만능 줄기 세포” 또는 “iPSC 또는 iPS 세포”로 불리운다.
- [0052] “배아 줄기 (ES) 세포”는 초기 단계의 배아, 예를 들어, 배반포 단계에서 내부 세포 마스로부터 수득되거나 또는 인위적인 수단 (예를 들어, 핵 치환)에 의해 생성되어 생식 세포 (예를 들어, 정자 및 난자)를 비롯한 배아 또는 성체에서 임의의 분화된 세포 유형이 될 수 있는 미분화된 만능 세포이다.
- [0053] “유도성 만능 줄기 세포 (iPSC 또는 iPS 세포)”는 인자들 (본원에서 재프로그래밍 인자로 언급되는) 조합의 발현 또는 그 발현을 유도함으로써 체세포를 재프로그래밍하여 생성된 세포이다. iPS 세포는 태아, 출생후, 신생, 발육기, 또는 성체 체세포를 사용하여 생성될 수 있다. 특정 구현예에서, 체세포를 만능 줄기 세포로 재프로그래밍하는데 사용될 수 있는 인자들로는, 예를 들어, Oct4 (Oct 3/4로도 언급됨), Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog 및 Lin28을 포함한다. 일부 구현예에서, 체세포는 체세포를 만능 줄기 세포로 재프로그래밍하기 위한 적어도 2개의 재프로그래밍 인자, 적어도 3개의 재프로그래밍 인자, 또는 적어도 4개의 재프로그래밍 인자, 적어도 5개의 재프로그래밍 인자, 적어도 6개의 재프로그래밍 인자 또는 적어도 7개의 재프로그래밍 인자를 발현시켜 체세포를 만능 줄기 세포로 재프로그래밍함에 의해 재프로그래밍화된다.
- [0054] “조혈 선조체 세포” 또는 “조혈 전구체 세포”는 조혈 계통에 속하지만 추가의 조혈 분화를 할 수 있는 세포를 언급하고, 조혈 줄기 세포, 다능성 조혈 줄기 세포, 통상의 골수 선조체, 거핵세포 선조체, 적혈구 선조체, 및 림프구 선조체를 포함한다. 조혈 줄기 세포 (HSC)는 골수 (단핵구 및 대식세포, 과립구(호중구, 호염구, 호산구, 및 비만 세포), 적혈구, 거핵세포/혈소판, 수지상 세포), 및 림프구 계통(T-세포, B-세포, NK-세포)를 포함하는 모든 혈액 세포 유형을 유도하는 다능성 줄기 세포이다(문헌참조: 예를 들어, Doulatov *et al.*, 2012; Notta *et al.*, 2015). “다중림프구 선조체” (MLP)는 모든 림프구 계통(B, T, 및 NK 세포)을 유도하지만, 다른 (골수) 잠재력(문헌참조: Doulatov *et al.*, 2010)을 갖거나 갖지 않을 수 있는 임의의 선조체를 기재하기 위해 정의되고 CD45RA⁺/CD10⁺/CD7⁻이다. 임의의 B, T, 및 NK 선조체는 MLP로서 언급될 수 있다. “통상의 골수 선조체” (CMP)는 과립구, 단핵구, 거핵세포 및 적혈구를 유도할 수 있는 CD45⁺/CD31⁺/CD43⁺/CD34⁻ 세포의 발현에 의해 한정되는 통상의 골수 선조체를 언급한다. 조혈 선조체 세포는 CD34를 발현할 수 있다. 조혈 선조체 세포는 CD133을 동시에 발현할 수 있고 CD38 발현에 대해 음성일 수 있다. 조혈 전구체 세포는 CD34⁺/CD45⁺ 조혈 전구체 세포 및 CD34⁺/CD45⁺/CD43⁺ 조혈 전구체 세포를 포함한다. CD34⁺/CD43⁺/CD45⁺ 조혈 전구체 세포는 골수 선조체에 대해 고도로 집적될 수 있다. 조혈 세포는 또한 CD34⁻/CD133⁺/CD38⁻ (원시 조혈 전구체 세포), CD43(+)/CD235a(+)/CD41a(+/-) (적혈구-거핵세포), lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(-) (다능성), 및 lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(+) (골수-편향된) 세포, CD133+/ALDH+ (알데하이드 탈하이드로게나제)를 포함하는 원시 조혈 세포의 다양한 서브세트를 포함한다. 임의의 이들 원시 조혈 세포 유형 또는 조혈 전구체 세포는 본원에 기재된 바와 같이 iPS 세포로 전환될 수 있는 것으로 예상된다. 일부 양상에서, 상기 세포는 비만 세포, 랑게르한스 세포(Langerhan's cells), 과골세포, NK 세포, T 세포, CIK T 세포, 또는 다른 서브세트의 T 세포, NK 세포, 및 B 세포를 포함할 수 있다.
- [0055] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “면역 세포(들)”은 T 세포, NK 세포, T/NK 세포, 수지상 세포, 대식세포, B 세포, 호중구, 적혈구, 단핵구, 호염구, 호중구, 비만 세포, 호산구, 및 이의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0056] T 세포의 “활성화인자” 또는 T 세포를 활성화시키는 조건은 T 세포를 활성화시키는 자극을 언급하고 상원 제

공 세포 상에 또는 다른 표면 상에 제공될 수 있는 항원; 특이성에 상관없이 많은 T 세포 수용체(TCR) 복합체에 결합하는 폴리클로날 활성화인자를 포함하고, 렉틴, 예를 들어, 콘카나발린-A (Con-A) 및 피토헤마글루티닌 (PHA) 및 TCR 또는 CD3 단백질 상에 불변 골격 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 같은 제제; 및 상당수의 T 세포를 자극하는 슈퍼 항원을 포함하고, 예를 들어, 스타필로코커스성 장독소와 같은 장독소를 포함한다.

[0057] 용어 “T 림프구” 및 “T 세포”는 상호교환적으로 사용되고, 하나 이상의 MHC 분자, 또는 하나 이상의 비-전 형적 MHC 분자와 함께 항원 제공 세포 또는 매트릭스의 표면에 나타나는 경우 항원을 인지할 수 있는 TCR을 발현하는 세포를 언급한다.

[0058] 용어 “T 세포”는 당업계에서 한정된 바와 같은 T 림프구를 언급하고 흉선 세포, 미성숙한 T 림프구, 성숙한 T 림프구, 휴지기 T 림프구, 또는 활성화된 T 림프구를 포함하는 것으로 의도된다. 상기 T 세포는 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, $CD4^+CD8^+$ T 세포, 또는 $CD4^-CD8^-$ 세포일 수 있다. 상기 T 세포는 또한 T 헬퍼 세포, 예를 들어, T 헬퍼 1 (TH1), 또는 T 헬퍼 2 (TH2) 세포, 또는 TH17 세포, 및 세포독성 T 세포, 조절 T 세포, 천연 킬러 T 세포, 순수 T 세포, 기억 T 세포, 또는 감마 델타 T 세포일 수 있다(문헌참조: Wilson *et al.*, 2009; Wynn, 2005; Ladi *et al.*, 2006). $CD4$ 와 같은 적어도 하나의 마커에 의해 서로 상이한 T 세포는 본원에서 T 세포의 “서브세트”로 언급된다.

[0059] “ $CD4^+$ T 세포”는 이들의 표면 상에 $CD4$ 를 발현하고 세포-매개된 면역 반응과 연관된 T 세포 서브세트를 언급 한다. 이들은 자극 후 분비 프로파일을 특징으로 하고 이는 IFN-감마, TNF-알파, IL-2, IL-4 및 IL-10와 같은 사이토킨의 분비를 포함할 수 있다. “ $CD4$ ”는 T-림프구 상에 분화 항원으로서 본래 정의된 55-kD 당단백질이 지 만 또한 단핵구/대식세포를 포함하는 다른 세포 상에서 발견된다. $CD4$ 항원은 면역글로불린 슈퍼 유전자 패밀 리의 구성원이고, MHC (주요 조직적합성 복합체) 부류 II-제한된 면역 반응에서 연합된 인지 요소들로서 관련된다. T-림프구 상에서 이들은 헬퍼/유도인자 서브세트를 한정한다.

[0060] “ $CD8^+$ T 세포”는 이들의 표면 상에서 $CD8$ 을 발현하는 T 세포 서브세트를 언급하고, 이는 MHC 부류 I-제한되고 세포독성 T 세포로서 기능한다. “ $CD8$ ” 분자는 흉선 세포상에서 및 세포독성 및 서프레서 T-림프구 상에서 발 견되는 분화 항원이다. $CD8$ 항원은 면역글로불린 슈퍼유전자 패밀리의 구성원이고 주요 조직적합성 복합체 부류 I-제한된 상호작용에서 연합된 인지 요소이다.

[0061] “만능 줄기 세포”는 하나 이상의 조직 또는 기관, 또는 바람직하게 임의의 3개의 생식 층: 내배엽(내부 위 내 벽(interior stomach lining), 위장관, 폐), 중배엽(근육, 골, 혈액, 비뇨생식기), 또는 외배엽(상피 조직 및 신경계)를 구성하는 모든 세포로 분화하는 잠재력을 갖는 줄기 세포를 언급한다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “체세포”는 난자, 정자 등과 같은 생식 세포 이외의 임의의 세포를 언급하고 이 것은 이의 DNA를 다음 세대로 직접 전달하지 못한다. 전형적으로, 체세포는 제한된 다능성을 갖거나 다능성을 갖지 않는다. 본원에 사용된 체세포는 천연적으로 존재하거나 유전학적으로 변형될 수 있다.

[0063] “프로그래밍”은 세포가 생성할 수 있는 후손의 유형을 변화시키는 공정이다. 예를 들어, 세포는 이것이 프로 그래밍 없이 동일한 조건하에서 형성할 수 있도록 하는 것과 비교하여 배양물 또는 생체내 적어도 하나의 새로 운 세포 유형의 후손을 형성할 수 있도록 변화된 경우 프로그래밍되었다. 이것은 충분한 증식 후, 필수적으로 어떠한 후손이 프로그래밍 전에 형성될 수 없는 경우, 새로운 세포 유형의 표현형 특징을 갖는 후손의 측정가능 한 비율이 관찰되었고; 대안적으로, 새로운 세포 유형의 특징을 갖는 비율은 프로그래밍 전 보다 측정가능하다. 상기 공정은 분화, 탈분화 및 전환분화를 포함한다.

[0064] “분화”는 덜 특수화된 세포가 보다 특수화된 세포 유형이 되는 공정이다. “탈분화”는 부분적으로 또는 최종 으로 분화된 세포가 초기 발육 단계, 예를 들어, 만능성 또는 다능성으로 되돌아가는 세포 공정이다. “전환분 화”는 하나의 분화된 세포 유형을 또 다른 분화된 세포 유형으로 형질전환시키는 공정이다. 전형적으로, 프로 그래밍에 의한 전환 분화는 중간 만능 단계를 거치는 것 없이 일어나고—즉, 상기 세포는 하나의 분화된 세포 유형으로부터 또 다른 분화된 세포 유형으로 직접 프로그래밍된다. 특정 조건하에서, 새로운 세포 유형의 특징 을 갖는 후손의 비율은 증가하는 선폭도 순서로 적어도 약 1%, 5%, 25% 이상일 수 있다.

[0065] “재프로그래밍”은 이것이 재프로그래밍 없이 동일한 조건하에서 갖는 것 보다 배양물 중 또는 생체내에서 적어 도 하나의 새로운 세포 유형의 후손을 형성하는 측정가능하게 증가된 능력을 세포 상에 부여하는 공정이다. 보 다 구체적으로, 재프로그래밍은 체세포 상에 만능 잠재력을 부여하는 공정이다. 이것은 충분한 증식 후, 필수적 으로 어떠한 상기 후손이 재프로그래밍 전에 형성될 수 없는 경우, 새로운 세포 유형의 표현형 특징을 갖는 후

손의 측정가능한 비율이 관찰되었고; 대안적으로, 새로운 세포 유형의 특징을 갖는 비율은 재프로그래밍 전 보다 측정가능하다. 특정 조건하에서, 새로운 세포 유형의 특징을 갖는 후손의 비율은 증가하는 선회도 순서로 적어도 약 1%, 5%, 25% 이상일 수 있다.

[0066] 용어 “정방향 프로그래밍”은 다능 또는 만능 세포에 하나 이상의 특이적 계통-결정 유전자들 또는 유전자 생성물을 제공함에 의해 어떠한 만능성을 갖지 않는 분화된 체세포와는 반대되는 바와 같이 다능 또는 만능 세포의 프로그래밍을 언급한다. 예를 들어, 정방향 프로그래밍은 ESC 또는 iPSC를 조혈 전구체 세포 또는 다른 전구체 세포로 또는 조혈 세포로 또는 다른 분화된 체세포로 프로그래밍하는 공정을 기재할 수 있다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “대상체” 또는 “이를 필요로 하는 대상체”는 세포 또는 조직 이식을 필요로 하는 임의의 나이에서 포유동물, 바람직하게 사람, 수컷 또는 암컷을 언급한다. 전형적으로 대상체는 세포 또는 조직 이식을 통한 치료에 순응할 수 있는 장애 또는 병리학적 또는 목적하지 않은 병태, 상태 또는 증후군, 또는 증후군 또는 물리적, 형태학적 또는 생리학적 비정상상으로 인해 세포 또는 조직 이식 (또한 본원에서 수용자로서 언급됨)을 필요로 한다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같은, 유전자의 “파괴”는 파괴 부재하에 유전자 생성물의 발현 수준과 비교하여, 세포에서 대상체 유전자에 의해 암호화된 하나 이상의 유전자 생성물의 발현의 제거 또는 감소를 언급한다. 예시적인 유전자 생성물은 유전자에 의해 암호화된 mRNA 및 단백질 생성물을 포함한다. 일부 경우에 파괴는 일시적이거나 가역적이고 다른 경우에 영구적이다. 일부 경우에 파괴는 절단된 또는 비-기능성 생성물이 생성될 수 있다는 사실에도 불구하고 기능성 또는 전장 단백질 또는 mRNA에 대한 것이다. 본원에서 일부 구현예에서, 발현과는 반대로 유전자 활성 또는 기능은 파괴된다. 유전자 파괴는 일반적으로 인공 방법에 의해, 즉, 화합물, 분자, 복합체 또는 조성물의 첨가 또는 유도에 의해 및/또는 DNA 수준에서와 같이 유전자의 핵산 또는 이와 연관된 핵산의 파괴에 의해 유도된다. 유전자 파괴를 위한 예시적 방법은 유전자 사일런싱, 녹다운, 녹아웃, 및/또는 유전자 편집과 같은 유전자 파괴 기술을 포함한다. 이의 예는 안티센스 기술, 예를 들어, 일반적으로 발현의 일시적 감소를 유도하는, RNAi, siRNA, shRNA, 및/또는 리보자임과 같은 안티센스 기술, 및 예를 들어, 절단 유도 및/또는 상동성 재조합에 의한 표적화된 유전자 불활성화 또는 파괴를 유도하는 유전자 편집 기술을 포함한다. 이의 예는 삽입, 돌연변이 및 결실을 포함한다. 상기 파괴는 전형적으로 유전자에 의해 암호화된 정상 또는 “야생형” 생성물 발현의 억제 및/또는 완전한 부재를 유도한다. 상기 유전자 파괴의 예는 삽입, 판독전환(frameshift) 및 미스센스 돌연변이, 전체 유전자의 결실을 포함하는, 유전자 또는 유전자 일부의 결실, 녹인(knock-in) 및 녹아웃(knock-out)이다. 상기 파괴는 암호화 영역에서, 예를 들어, 하나 이상의 엑손에서 발생하여 예를 들어, 종료 코돈의 삽입에 의한 것과 같이 전장 생성물, 기능성 생성물 또는 임의의 생성물을 생성하지 못하는 능력을 유도할 수 있다. 상기 파괴는 또한 유전자의 전사를 방지하도록, 프로모터 또는 인핸서 또는 전사의 활성화에 영향을 미치는 다른 영역 내 파괴에 의해 발생할 수 있다. 유전자 파괴는 상동성 재조합에 의한 표적화된 유전자 불활성화를 포함하는, 유전자 표적화를 포함한다.

[0069] “노치(Notch) 리간드”는 조혈 줄기 세포와 같은 다수의 상이한 포유동물세포의 막에 존재하는 노치 수용체 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 단백질이다. 사람 세포에서 동정된 노치 수용체는 노치-1, 노치-2, 노치-3, 및 노치-4를 포함한다. 노치 리간드는 전형적으로 세포의 표면 상에 아미노 말단에서 및 3 내지 8개 EGF-유사 반복체 사이에서 20 내지 22개 아미노산을 포함하는 DSL 도메인 (D-텔라, S-세라테(Serrate), 및 L-Lag2) 을 갖는다(문헌참조: Furie and Furie, 1988; Knust *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1987) on the extracellular surface.

[0070] “슈퍼 공여자 (Super donor)”는 본원에서 특정 MHC 부류 I 및 II 유전자에 대해 동종접합성인 개체로서 언급된다. 이러한 동종접합성 개체들은 슈퍼 공여체로서 작용할 수 있으며, 조직을 비롯한 이들의 세포 및 이들의 세포를 포함하는 기타 물질들은 해당 반수체형에 대해 동종접합성 또는 이종접합성인 개체에 이식될 수 있다. 상기 슈퍼 공여자는 각각 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP 또는 HLA-DQ 유전자좌/유전자좌 대립유전자에 대해 동종접합성일 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “키메라 항원 수용체(CAR)”는 예를 들어, 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 또는 키메라 면역수용체를 언급할 수 있고, 특정 면역 이펙터 세포 상으로의 인공 특이성이 이식된 가공된 수용체를 포함한다. CAR은 모노클로날 항체의 특이성을 T 세포상으로 부여함으로써 다수의 특이적 T 세포가, 예를 들어, 입양 세포 치료요법에 사용하기 위해 생성되도록 할 수 있다. 특이적 구현예에서, CAR은 세포의 특이성을 예를 들어, 종양 연관 항원에 지시한다. 일부 구현예에서, CAR은 세포내 활성화 도메인, 막관통 도메인 및 종양 연관 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, CAR은 CD3-제타 a 막관통 도메인 및 엔도도메인에 융합된 모노클로날 항체로부터 유래된 단일쇄 가변 단편 (scFv)의 융합체를 포함한다.

다. 다른 CAR 디자인의 특이성은 수용체의 리간드 (예를 들어, 펩타이드)로부터 또는 텍틴과 같은 패턴-인지 수용체로부터 유래할 수 있다. 특정 경우에, 항원 인지 도메인의 공간은 활성화 유도된 세포사를 감소시키기 위해 변형될 수 있다. 특정 경우에, CAR은 CD3 ζ , FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10, 및/또는 OX40과 같은 추가의 동시-자극 신호전달을 위한 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 분자는 동시-자극 분자, 이미징화를 위한 리포터 유전자(예를 들어, 양전자 방출 단층 촬영술을 위해), 프로트릭, 호밍 수용체, 케모킨, 케모킨 수용체, 사이토킨 및 사이토킨 수용체의 첨가 시 T 세포를 조건적으로 절제하는 유전자 생성물을 포함하는, CAR과 함께 동시 발현될 수 있다.

[0072] 용어 “항원 제공세포 (APC)” 는 면역계의 특이적 이펙터 세포에 의해 인지될 수 있는 펩타이드-MHC 복합체의 형태 내 하나 이상의 항원을 제공함으로써 제공된 항원 또는 항원들에 대해 효과적인 세포 면역 반응을 유도할 수 있는 세포 부류를 언급한다. APC는 대식세포, B 세포, 내피 세포, 활성화된 T 세포, 및 수지상세포와 같은 온전한 전체 세포; 또는 β 2-마이크로글로불린에 복합체화된 정제된 MHC 부류 I 분자와 같은 천연적으로 존재하거나 합성인 다른 분자일 수 있다. 많은 유형의 세포는 T 세포 인지를 위해 이들의 세포 표면 상에 항원을 제공할 수 있고, 단지 수지상세포는 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 위한 순수 T 세포반응을 활성화시키기 위한 유효량으로 항원을 제공하는 능력을 갖는다.

[0073] II. 만능 줄기 세포

[0074] 특정 구현예에서, 만능 줄기 세포는 CAR과 같은 항원 수용체를 발현하도록 가공된다. 만능 줄기 세포는 유도된 만능 줄기 세포 및 배아 줄기 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 줄기 세포일 수 있다. 특정 양상에서, 본원에서 사용된 만능 줄기 세포는 사람 배아 줄기 세포(ESC) 또는 유도된 만능 줄기 세포(iPSC)이고, 이들은 시험관내 장기간 증식할 수 있고, 본원 개시내용의 조혈 전구체 세포를 포함하는, 신체의 모든 세포 유형으로 분화하는 잠재력을 보유한다.

[0075] A. 배아 줄기 세포

[0076] 특정 양상에서, ESC로서 만능 줄기 세포. ES 세포는 배반포의 내부 세포 매끄로부터 유래하며, 높은 시험관내 분화능을 갖는다. ES 세포는 발달기 배아의 외부 영양외배엽층을 제거한 후, 성장하지 않는 세포의 피더 층 상에서 내부 매끄 세포를 배양함으로써 단리될 수 있다. 재분주된 세포는 계속 증식하여 ES 세포의 새로운 콜로니를 생산할 수 있으며, 이들도 제거, 해리, 다시 재분주하여 성장하도록 할 수 있다. 이러한 미분화 ES 세포의 “계대배양” 공정은 수회 반복하여 미분화 ES 세포를 함유하는 세포주를 생성할 수 있다 (미국특허 제 5,843,780호; 제6,200,806호; 제7,029,913호). ES 세포는 그들의 만능성을 유지하면서 증식할 수 있는 잠재력을 갖는다. 예를 들어, ES 세포는 세포 분화를 제어하는 세포상 및 유전자 상의 연구에 있어서 유용하다. 유전자 조작 및 선택과 조합된 ES 세포의 만능성은 유전자전이, 키메라 및 녹아웃 마우스의 생성을 통한 생체내 유전자 분석 연구에 사용될 수 있다.

[0077] 마우스 ES 세포를 제조하는 방법은 잘 알려져 있다. 한 방법에서, 129마리의 마우스 종의 이식전 배반포를 마우스 항혈청으로 처리하여 영양외배엽을 제거하고, 소태아 혈청을 함유하는 배지 중에서 화학적으로 불활성화된 마우스 배아 섬유아세포의 피더 세포 층 상에 내부 세포 매끄를 배양한다. 발달기의 미분화 ES 세포의 콜로니를 소태아 혈청의 존재 하에 마우스 배아 섬유아세포 피더 층 상에 계대배양시켜 ES 세포 집단을 생성한다. 일부 방법에서, 마우스 ES 세포는 피더 층의 부재 하에 혈청 함유 배양 배지에 사이토킨 백혈병 억제인자 (LIF)를 첨가함으로써 성장시킬 수 있다. 다른 방법에서, 마우스 ES 세포는 골형성 단백질 및 LIF의 존재 하에 무혈청 배지 중에서 성장시킬 수 있다.

[0078] 사람 ES 세포는 정자 및 난자 세포의 융합, 핵 전달, 발병기전, 또는 염색질의 재프로그래밍 및 이전에 기술된 방법 (Thomson and Marshall, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000)에 의해 배아 세포를 생성하기 위한 원형질막으로 상기 재프로그래밍된 염색질의 후속 도입에 의해 생성된 접합자 (zygote) 또는 배반포 단계의 포유동물 배아로부터 생성 또는 유래할 수 있다. 한 방법에서, 사람 배반포를 항인간 혈청에 노출시키고, 영양외배엽 세포를 용해시켜 마우스 배아 섬유아세포의 피더 층 상에서 배양된 내부 세포 매끄로부터 이를 제거한다. 추가로, 내부 세포 매끄로부터 유래한 세포 무리를 화학적으로 또는 기계적으로 해리, 재분주하고, 미분화 형태의 콜로니들은 마이크로피펫으로 선택, 해리 및 재분주한다. 일부 방법에서, 사람 ES 세포는 염기성 섬유아세포 성장 인자의 존재 하에 섬유아세포의 피더 층 상에 ES 세포를 배양함으로써 혈청없이 성장시킬 수 있다. 다른 방법에서, 사람 ES 세포는 염기성 섬유아세포 성장 인자를 함유하는 “조건화된” 배지의 존재 하에 MATRIGELTM 과 같은 단백질 매트릭스 또는 라미닌 상에서 상기 세포를 배양함으로써 피더 세포층 없이 성장시킬 수 있다 (Xu *et al.*,

2001).

- [0079] ES 세포는 또한 이전에 기술된 방법 (문헌참조: Thomson, and Marshall, 1998; Thomson *et al.*, 1995; Thomson and Odorico, 2000)에 의해 레서스 몽키 (rhesus monkey) 및 마모셋(marmoset)을 비롯한 다른 유기체 및 확립된 마우스 및 사람 세포주로부터도 유래할 수 있다. 예를 들어, 확립된 인간 ES 세포주는 MAOI, MA09, ACT-4, HI, H7, H9, H13, H14 및 ACT30을 포함한다. 추가의 예로서, 확립된 마우스 ES 세포주는 마우스 중 129개의 배아의 내부 세포 매스로부터 확립된 CGR8 세포주를 포함하며, CGR8 세포의 배양물은 피더 층 없이 LIF의 존재 하에 성장할 수 있다.
- [0080] ES 줄기 세포는 전사 인자 Oct4, 알칼리 포스포타아제 (AP), 발생단계 특이적 태아성 항원 SSEA-1, 발생단계 특이적 태아성 항원 SSEA-3, 발생단계 특이적 태아성 항원 SSEA-4, 전사 인자 NANOG, 종양 거부 항원 1-60 (TRA-1-60), 종양 거부 항원 1-81 (TRA-1-81), SOX2 또는 REX1를 포함하는 단백질 마커에 의해 검출될 수 있다.
- [0081] **B. 유도된 만능 줄기 세포**
- [0082] 다른 양상에서, 본원에 사용된 만능 줄기 세포는 통상적으로 iPS 세포 또는 iPSC로 약칭되는 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포이다. 만능성의 유도는 만능성과 연결된 전사 인자의 도입을 통한 체세포의 재프로그래밍에 의해, 최초로 2006년에 마우스 세포를 사용하고(Yamanaka *et al.* 2006) 2007년에 사람 세포를 사용하여(Yu *et al.* 2007; Takahashi *et al.* 2007) 성취되었다. iPSC의 사용으로 ES 세포의 대규모 임상적 용도와 관련된 대부분의 윤리적 및 실질적인 문제들을 극복하며, iPSC 유래의 자가 이식물을 갖는 환자들은 이식 거부를 방지하기 위해 일생동안 면역억제 치료제를 필요로 하지 않을 수 있다.
- [0083] 생식 세포를 제외하고는, 어떤 세포라도 iPCS를 위한 출발점으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포형은 케라틴 세포, 섬유아세포, 조혈 세포, 간엽 세포, 간세포 또는 위세포일 수 있다. T 세포는 재프로그래밍을 위한 체세포 공급원으로도 사용될 수 있다 (미국특허 8,741,648). 세포 분화의 정도 또는 해당 세포가 수집되는 동물의 연령에는 제한이 없으며; 미분화 선조체 세포 (체세포 줄기 세포를 포함) 및 최종적으로 분화된 성숙한 세포조차도 본원에 개시된 방법에서 체세포의 공급원으로 사용될 수 있다.
- [0084] 체세포는 당업자에게 공지된 방법들을 사용하여 재프로그래밍되어 iPSC를 생성할 수 있다. 당업자라면 용이하게 유도된 만능 줄기 세포를 생성할 수 있으며, 이에 대해서는 예를 들어, 공개된 미국 특허출원 20090246875호, 공개된 미국 특허출원 2010/0210014호; 공개된 미국 특허출원 20120276636호; 미국특허 8,058,065호; 미국특허 8,129,187호; 미국특허 8,268,620호; PCT 공보 WO 2007/069666 A1호, 및 미국특허 8,268,620호를 참조하고, 이들은 본원에 참고로 인용된다. 일반적으로, 핵 재프로그래밍 인자를 사용하여 체세포로부터 만능 줄기 세포를 생성한다. 일부 실시양태에서, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog 및 Lin28을 사용한다. 다른 구현예에서, Oct3/4, Sox2, c-Myc 및 Klf4를 사용한다.
- [0085] 이들 핵 재프로그래밍 물질의 마우스 및 사람 cDNA 서열은 본원에 참고로 인용되는 WO 2007/069666호 및 미국특허 제8,183,038호에 언급된 NCBI 등록 번호를 참조하여 이용가능하다. 하나 이상의 재프로그래밍 물질, 또는 이러한 재프로그래밍 물질을 암호화하는 핵산을 도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국특허 제8,268,620호, 제8,691,574호, 제8,741,648호, 제8,546,140호, 공개된 미국 특허 제8,900,871호 및 미국특허 제8,071,369호 (양 특허 모두 본원에 참고로 인용됨)에 개시되어 있다.
- [0086] iPSC는 일단 유도되면 다능성을 유지하기에 충분한 배지 중에서 배양될 수 있다. iPSC는 미국 특허 7,442,548호 및 미국 특허 공개 공보 제2003/0211603호에 기술된 바와 같은 만능 줄기 세포, 보다 구체적으로, 배아 줄기 세포를 배양하기 위해 개발된 다양한 배지 및 기술과 함께 사용될 수 있다. 마우스 세포의 경우, 통상적인 배지에 분화 억제 인자로서 백혈병 억제인자 (LIF)를 첨가하여 배양을 수행한다. 사람 세포의 경우, LIF 대신에 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF)를 첨가하는 것이 요망될 수 있다. 당업자에게 공지된 바와 같은 iPSC의 배양 및 유지를 위한 기타 방법들도 본 발명에 따라 사용될 수 있다.
- [0087] 특정 구현예에서, 비한정 조건이 사용될 수 있는데; 예를 들어, 만능 세포는 섬유아세포 피더 세포 또는 줄기 세포를 미분화 상태로 유지하기 위해 섬유아세포 피더 세포에 노출된 배지 상에서 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 피더 세포로서 세포 분화를 종료시키기 위해 방사선 또는 항생제로 처리된 마우스 배아 섬유아세포의 공존 하에 배양된다. 대안적으로, 만능 세포는 TESR™ 배지 (Ludwig *et al.*, 2006a; Ludwig *et al.*, 2006b) 또는 E8™/필수 8™ 배지 (Chen *et al.*, 2011)와 같은 한정된 피더 독립적인 배양 시스템을 사용하여 배양되어 필수적으로 미분화 상태로 유지될 수 있다.
- [0088] 플라스미드는 조절된 고카피수를 달성하고, 세균에서 플라스미드 불안정성의 잠재적 요인을 회피하며, 사람 세

포를 비롯한 포유동물 세포에서의 사용과 상용성인 플라스미드 선택을 위한 수단을 제공하는 것과 같이 다수의 목적을 염두에 두고 디자인되었다. 사람 세포에서 사용하기 위한 플라스미드의 이원적 요건이 특히 주목되었다. 첫째, 이들은 이. 콜라이(E. Coli)에서의 유지 및 발효에 적절하여, 다량의 DNA를 생성하고 정제할 수 있다. 둘째, 이들은 사람 환자 및 동물에 사용하기에 안전하고 적절하다. 첫번째 요건은 세균 발효 동안 선택되어 상대적으로 용이하게 안정적으로 유지될 수 있는 고카피수의 플라스미드를 필요로 한다. 두번째 요건은 선택가능한 마커 및 기타 암호화 서열과 같은 요소들에 대한 주의를 필요로 한다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 플라스미드는 하기로 구성된다: (1) 고카피수의 복제 오리진, (2) 선택가능한 마커, 예를 들어, 이에 제한되지는 않지만, 가나마이신을 이용한 항생제 선별을 위한 네오 유전자, (3) 티로시나제 인핸서를 포함하는, 전사 종결 서열, (4) 다양한 핵산 카세트의 도입을 위한 다중클로닝 부위; 및 (5) 티로시나제 프로모터에 작동가능하게 연결된 마커를 암호화하는 핵산서열. 단백질을 암호화하는 핵산을 유도하기 위해 당업계에 공지된 수많은 플라스미드 벡터들이 존재한다. 이들의 예로는, 이에 제한되지는 않지만, 미국 특허 제6,103,470호; 미국 특허 제7,598,364호; 미국 특허 제7,989,425호; 및 미국 특허 제6,416,998호에 개시된 벡터들을 포함하며, 상기 특허문헌들은 본원에 참고로 인용된다.

[0089] 에피솜 유전자 전달 시스템은 플라스미드, 엡스타인-바르 바이러스 (EBV)계 에피솜 벡터(미국 특허 제8,546,140호), 효모계 벡터, 아데노바이러스계 벡터, 시미안 바이러스 40 (SV40)계 에피솜 벡터, 소 파필로마 바이러스 (BPV)계 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다. 바이러스 유전자 전달 시스템은 RNA계 또는 DNA계 바이러스 벡터일 수 있다.

[0090] 1. iPSC의 생성을 위한 세포

[0091] 본원 개시내용의 특정 구현예는 iPSC로 재프로그래밍된 체세포 (예를 들어, 혈액 세포 또는 피부 세포)의 출발 집단에 관한 것이다. 혈액 세포 집단은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 전혈 또는 혼합 집단을 함유하는 분획, 비장 세포, 골수 세포, 종양 침윤 림프구, 백혈구성분체집술에 의해 수득된 세포, 생검 조직, 및 림프절, 예를 들어, 종양으로부터 배수된 림프절을 포함할 수 있다. 적합한 공여자는 면역화된 공여자, 비-면역화된 (순수) 공여자, 처리된 또는 비처리된 공여자를 포함한다. “처리된” 공여자는 하나 이상의 생물학적 개질제에 노출된 것이다. “비처리된” 공여자는 하나 이상의 생물학적 개질제에 노출되지 않았다.

[0092] 일부 양상에서, 혈액 세포의 집단은 T 세포를 포함한다. 상기 T 세포는 T 세포의 정제된 집단일 수 있거나, 대안적으로 T 세포는 B 세포 및/또는 다른 말초 혈액 세포와 같은 상이한 유형의 세포를 갖는 집단에 존재할 수 있다. 상기 T 세포는 $CD4^{+}$ T 세포와 같은 T 세포 서브세트의 정제된 집단일 수 있거나, 이들은 상이한 T 세포 서브세트를 포함하는 T 세포 집단일 수 있다. 또 다른 구현예에서, T 세포는 연장된 기간 동안 배양물에 유지된 T 세포 클론이다. T 세포 클론은 상이한 정도로 형질전환될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 배양물에서 무제한으로 증식하는 T 세포 클론이다.

[0093] 일부 양상에서, T 세포는 원발성 T 세포이다. 용어 “원발성 T 세포”는 연장된 기간 동안 배양물 중에 유지된 T 세포와는 반대로 개체로부터 수득된 T 세포를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 원발성 T 세포는 특히 대상체로부터 수득된 말초 혈액 T 세포이다. 원발성 T 세포 집단은 T 세포의 대부분의 하나의 서브세트로 구성될 수 있다. 대안적으로, 원발성 T 세포 집단은 T 세포의 상이한 서브세트들로 구성될 수 있다.

[0094] T 세포는 이전에 저장된 혈액 샘플로부터, 건강한 개체로부터 또는 대안적으로 병태를 앓는 개체로부터 기원할 수 있다. 상기 병태는 바이러스 감염, 세균 감염 또는 임의의 다른 미생물에 의한 감염, 또는 과증식성 질환, 예를 들어, 흑색종과 같은 암으로부터 비롯되는 병태와 같은 감염성 질환일 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 사람 면역결핍 바이러스 (HIV)로 감염된 개체로부터 기원한다. 여전히 또 다른 구현예에서, T 세포는 자가면역 질환 또는 T 세포 병리를 앓거나 이에 민감한 대상체로부터 기원한다. T 세포는 사람 기원, 무린 기원 또는 임의의 다른 포유동물 종의 것일 수 있다.

[0095] T 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 당업계에 공지된 방법에 따라 기재된 바와 같이 수득될 수 있다. 상기 방법의 예는 실시예에 제시되어 있고 문헌(참조: Kim *et al.* (1992); Biswas *et al.* (1990); Biswas *et al.* (1991))에 의해 논의된다.

[0096] 일부 양상에서, 혈액 세포의 출발 집단은 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함한다. HSC는 정상적으로 골수에 체류하지만 혈액으로 강압될 수 있고 이 공정은 임상적으로 말초 혈액에서 다수의 HSC를 수확하기 위해 사용되는 가동화 (mobilization)로 호칭된다. 선택된 하나의 가동화 제제는 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF)이다. 말초 혈액 중에 순환하는 $CD34^{+}$ 조혈 줄기 세포 또는 선조체는 교란되지 않은 상태로 또는 G-CSF와 같은 조혈 성장 인자의

외부 투여에 따른 가동화 후 성분채집 기술에 의해 수거될 수 있다. 가동화 후 수거된 줄기 또는 선조체 세포의 수는 교란되지 않은 상태에서 성분채집 후 수득된 것을 초과한다. 일부 양상에서, 세포 집단의 공급원은 이의 세포가 조혈 줄기 세포 또는 선조체 세포를 집적할 필요가 없기 때문에 외부적으로 적용된 인자에 의해 가동화되지 않는 대상체이다.

[0097] 세포 집단으로부터 조혈 전구체 세포를 수득하는 방법은 또한 당업계에 공지되어 있다. 조혈 전구체 세포는 hSCF, hFLT3, 및/또는 IL-3와 같은 다양한 사이토킨을 사용하여 확장될 수 있거나 (Akkin et al., 1996), CD34⁺ 세포는 MACS 또는 FACS를 사용하여 집적될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 음성 선택 기술은 또한 CD34⁺ 세포를 집적하기 위해 사용될 수 있다.

[0098] 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 세포 집단은 포유동물 세포, 예를 들어, 사람 세포, 비-사람 영장류 세포, 설치류 세포(예를 들어, 마우스 또는 래트), 소 세포, 면양(ovine) 세포, 돼지 세포, 말 세포, 양 세포, 개 세포 및 고양이 세포 또는 이의 혼합물일 수 있다. 비-사람 영장류 세포는 레서스 마카쿠에 세포를 포함한다. 상기 세포는 동물, 예를 들어, 사람 환자로부터 수득될 수 있거나 이들은 세포주로부터 기원할 수 있다. 세포가 동물로부터 수득되는 경우, 이들은 예를 들어, 비분리된 세포 (즉, 혼합 집단)로서 사용될 수 있고; 이들은 처음에 예를 들어, 형질전환에 의해 배양물 중에서 확립될 수 있거나; 이들은 예비 정제 방법에 적용될 수 있다. 예를 들어, 세포 집단은 세포 표면 마커의 발현을 기준으로 하는 양성 또는 음성 선택에 의해 조작되거나; 시험관내 또는 생체내에서 하나 이상의 항원으로 자극되거나; 시험관내 또는 생체내에서 하나 이상의 생물학적 개질제로 처리되거나 이들 모두 또는 임의의 조합에 의해 처리된다. 예시적 구현예에서, 세포 집단은 비-T 세포 및/또는 특정 T 세포 서브세트의 고갈에 대한 음성 선택에 적용된다. 음성 선택은 B 세포 마커, 예를 들어, CD19, 및 CD20; 단핵구 마커 CD14; NK 세포 마커 CD56을 포함하는 다양한 분자의 세포 표면 발현을 기반으로 수행될 수 있다. 대안적으로, 세포 집단은 비-CD34⁺ 조혈 세포 및/또는 특정 조혈 세포 서브세트의 고갈을 위한 음성 선택에 적용될 수 있다. 음성 선택은 예를 들어, MACS 또는 컬럼 분리를 통해 다른 세포 유형의 분리를 위해 사용될 수 있는, 항체 카테일과 같은 다양한 분자 (예를 들어, CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a, 및 CD41 (예를 들어, 거핵세포 계통의 세포에 대해)의 세포 표면 발현을 기준으로 수행될 수 있다.

[0099] 또한, 대상체로부터 세포 샘플을 수득할 수 있고 이어서 목적하는 세포 유형을 위해 이를 집적할 수 있다. 예를 들어, PBMC 및/또는 CD34⁺ 조혈 세포는 본원에 기재된 바와 같이 혈액으로부터 분리될 수 있다. 역류 원심분리 (Counter-flow centrifugation) (세척(elutriation))을 사용하여 PBMC로부터 T 세포를 집적할 수 있다. 세포는 또한 목적하는 세포 유형의 세포 표면 상에 에피토프에 결합하는 항체를 사용한 분리 및/또는 활성화와 같은 다양한 기술을 사용하여 다른 세포로부터 분리될 수 있고, 예를 들어, 일부 T-세포 분리 키트는 세포를 활성화시키는 것 및 이어서 동일한 비드를 사용한 컬럼 분리를 가능하게 하는 것 둘다를 위해 항체 접합된 비드를 사용한다. 사용될 수 있는 또 다른 방법은 수용체 개입에 의한 세포를 활성화시키는 것 없이 특이적 세포 유형을 선택적으로 집적시키기 위한 세포 표면 마커에 대한 항체를 사용하는 음성 선택을 포함한다.

[0100] 골수 세포는 장골능, 대퇴골, 경골, 척추, 늑골 또는 다른 골수강으로부터 수득될 수 있다. 골수는 환자로부터 취해질 수 있고 다양한 분리 및 세척 과정을 통해 분리될 수 있다. 골수 세포의 분리를 왕나 공지된 과정은 하기의 단계를 포함한다: a) 3개의 분획으로 골수 현탁액을 원심분리하고 중간 분획물 또는 버피코트를 수거하는 단계; b) 단계 (a)로부터 버피코트 분획물을 분리 유체, 통상적으로 피콜 (Ficoll) (제조원(Pharmacia Fine Chemicals AB)의 상표명)에서 1회 초과로 원심분리하고, 골수 세포를 함유하는 중간체 분획물을 수거하는 단계; 및 c) 재주입될 수 있는 골수 세포의 회수를 위해 단계 (b)로부터의 수거된 분획물을 세척하는 단계.

[0101] T 세포 내 집적된 세포 집단을 사용하고자 하는 경우, 상기 세포 집단은 연속 유동 세포 분리기를 사용한 백혈구 성분채집 및 기계적 성분채집에 의해 세포의 혼합 집단으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 Ficoll-Hypaque™ 농도구배 상에서 분리, 퍼콜 (Percoll) 농도구배 상에서 분리, 또는 세척(elutriation)을 포함하는 임의의 공지된 방법에 의해 버피 코트로부터 분리될 수 있다.

[0102] 특정 양상에서, T 세포는 T 세포 수용체에 결합하는 제제에 의해 활성화되어 T 세포 활성화를 위한 신호 전달 캐스케이드를 유발한다. 예를 들어, CD3 항체를 사용할 수 있다. 재프로그래밍을 위한 상당 수 및 증식 상태의 T 세포 확장을 위해, IL-2와 같은 사이토킨이 또한 사용될 수 있다. 특정 양상에서, 항-CD3 및 항-CD28 둘다 는 동시 자극이 관여하는 T 세포 활성화를 위해 사용될 수 있다. 대안적 양상에서, 플레이트 결합된 항-CD3과 같은 항-CD3의 가교 결합이 적용될 수 있다. 가용성 항-CD3을 사용하여 PBMC에서 T 세포를 활성화시키는 경우,

가용성 항-CD3 항체는 PBMC에서 APC에 결합할 수 있고 이는 이어서 항체를 T 세포로 제공한다. 단독의 가용성 항-CD3 항체가 정제된 T-세포의 집단에 사용되는 경우, 상기 언급된 이유 때문에 아네르기가 유발된다. 특정 구현에는 항-CD3 (OKT3) 및 IL2의 존재하에 T 세포를 배양함을 포함하고, 이는 고비용이고 번거로운 비드 또는 플레이트-결합된 항체를 사용할 필요가 없기 때문에 유리하고 편리하며; OKT3 및 IL2를 첨가한 후, PBMC의 세포 환경은 T 세포의 활성화를 도와준다. 이어서 T 세포는 우선적인 확장으로 인해 PBMC 배양물에서 다른 세포 유형보다 과밀화된다.

[0103] 특정 양상에서, 혈액 세포의 출발 집단은 예를 들어, 림프아구성 세포주 (LCL)와 같은 림프아구성 세포를 포함한다. LCL의 생성은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, B 세포를 엡슈타인-바르 바이러스 (Epstein-Barr virus) (EBV)로 감염시키는 것이다(Frisan *et al.*, 2001).

[0104] 2. 체세포의 재프로그래밍

[0105] 일부 구현예에서, 세포의 출발 집단 (예를 들어, T 세포)는 이미 전문이 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 공개 공보 제2014/0315304호에 기재된 방법에 의한 것과 같이 iPSC로 재프로그래밍된다. 본원의 개시내용의 특정 양상에서, 재프로그래밍 인자는 통합 벡터 또는 에피솜 벡터와 같은 하나 이상의 벡터에 포함되는 발현 카세트로부터 발현된다. 추가의 양상에서, 재프로그래밍 단백질은 단백질 형질도입에 의해 체세포 내로 직접 도입될 수 있다.

[0106] 당업자는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 작제하기 위한 장비를 잘 갖추고 있다(문헌참조: 예를 들어, Sambrook *et al.*, 2001 and Ausubel *et al.*, 1996, 이 둘다는 본원에 참조로 인용된다). 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 (박테리오파아지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스), 및 인공 염색체(예를 들어, YAC), 예를 들어, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 모로니 뮤린 백혈병 바이러스 벡터 (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV 등으로부터 유래된), 렌티바이러스 벡터(예를 들어, HIV-1, HIV-2, SIV, BIV, FIV 등으로부터 유래된), 복제 컴피턴트, 이의 복제 결핍 및 거트부재 (gutless) 형태를 포함하는 아데노바이러스(Ad) 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 시미안 바이러스 40 (SV-40) 벡터, 소 파필로마 바이러스 벡터, 엡슈타인-바르 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 하베이 뮤린 육종 바이러스 벡터, 뮤린 유방 종양 바이러스 벡터, 라우스 육종 바이러스 벡터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0107] a. 바이러스 벡터

[0108] 바이러스 벡터는 본원 개시내용의 특정 양상에서 제공될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터를 생성하는데 있어서, 비-피루 유전자는 전형적으로 이중성 (또는 비-고유) 단백질에 대한 유전자 또는 암호화 서열로 대체된다. 바이러스 벡터는 일종의 발현 작제물이고 이는 핵산 및 능히 단백질을 세포로 도입하기 위해 바이러스 서열을 사용한다. 특정 바이러스가 세포를 감염시키거나 수용체-매개된 세포내이입을 통해 세포에 진입하고 숙주 세포 계놈에 통합하고 안정하게 및 효율적으로 바이러스 유전자를 발현시키는 능력은 이들이 외래 핵산의 세포 (예를 들어, 포유동물 세포)로의 전달을 위해 매력적인 후보물이 되게 한다. 본원의 개시내용의 특정 양상의 핵산을 전달하기 위해 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비제한적인 예는 하기에 기재되어 있다.

[0109] 레트로바이러스는 이들의 유전자를 숙주 계놈에 통합시키고 대량의 외래 유전학적 물질을 전달하고, 광범위한 종 및 세포 유형을 감염시키고 특수 세포-주에서 패키징되는 이들의 능력으로 인해 유전자 전달 벡터로서 유망하다(문헌참조: Miller, 1992).

[0110] 레트로바이러스 벡터를 작제하기 위해, 핵산은 특정 바이러스 서열 대신 바이러스 계놈에 삽입되어 복제-결합인 바이러스를 생성한다. 비리온을 생성하기 위해, gag, pol, 및 env 유전자를 함유하지만 LTR 및 패키징 성분이 없는 패키징 세포주를 작제한다(문헌참조: Mann *et al.*, 1983). 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열과 함께 cDNA를 함유하는 재조합 플라스미드가 특수 세포주로 도입되는 경우 (예를 들어, 인산칼슘 침전에 의해), 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자로 패키징되도록 하고 이어서 이는 배양 배지로 분비된다(문헌참조: Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 이어서 수거하고, 임의로 농축시키고 유전자 전달을 위해 사용한다. 레트로바이러스 벡터는 광범위한 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 그러나, 통합 및 안정한 발현은 숙주 세포의 분열을 요구한다(문헌참조: Paskind *et al.*, 1975).

[0111] 렌티바이러스는 통상의 레트로바이러스 유전자 gag, pol, 및 env외에, 조절 또는 구조적 기능을 갖는 다른 유전자들을 함유하는 복합 레트로바이러스이다. 렌티바이러스 벡터는 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: 예를 들어, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; U.S. Patents 6,013,516 and

5,994,136).

- [0112] 재조합 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있고 생체내 및 생체의 유전자 전달 및 핵산 서열의 발현 둘다를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 비-분열 세포-여기서, 적합한 숙주 세포는 패키징 기능, 즉, gag, pol 및 env, 및 rev 및 tat를 함유하는 2개 이상의 벡터로 형질감염된다-를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스는 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제5,994,136호에 기재되어 있다.
- [0113] b.에피솜 벡터
- [0114] 플라스미드-또는 리포솜-기반 염색체의 (즉, 에피솜) 벡터의 사용은 또한 본원의 개시내용의 특정 양상에서 제공될 수 있다. 상기 에피솜 벡터는 예를 들어, oriP-기반 벡터, 및/또는 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 벡터를 포함할 수 있다. 이들 벡터는 DNA의 큰 단편이 세포로 도입되고 염색체 외부에서 유지되고 세포 사이클 당 1회 복제되고 딸 세포를 효율적으로 분할시키고 실질적으로 어떠한 면역 반응을 유발할 수 없도록한다.
- [0115] 특히, oriP-기반 발현 벡터의 복제를 위해 요구되는 유일한 바이러스 단백질인 EBNA-1은 세포 면역 반응을 유발하지 않는데 그 이유는 이것이 MHC 부류 I 분자의 제공을 위해 요구되는 프로세싱을 우회하는 효율적인 기전을 발달시키기 때문이다(문헌참조: Levitskaya *et al.*, 1997). 추가로, EBNA-1은 트랜스포 작용하여, 클로닝된 유전자의 발현을 증진시킬 수 있고, 일부 세포주에서 100배까지 클로닝된 유전자의 발현을 유도할 수 있다(문헌참조: Langle-Rouault *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1997). 최종적으로, 상기 oriP-기반 발현 벡터의 제조는 저렴하다.
- [0116] 다른 염색체의 벡터로는 다른 림프구친화성 헤르페스 바이러스계 벡터를 포함한다. 림프구친화성 헤르페스 바이러스는 림프아구세포 (예를 들어, 사람 B 림프아구세포) 내에서 복제하여 이의 천연 생활 사이클의 일부에 대한 플라스미드가 되는 헤르페스 바이러스이다. 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV)는 "림프구친화성" 헤르페스 바이러스가 아니다. 예시적인 림프구친화성 헤르페스 바이러스는, 이에 제한되지는 않지만 EBV, 카포시 육종 헤르페스 바이러스 (KSHV); 헤르페스 바이러스 사이미리(HS) 및 마렉 질환 바이러스 (MDV)를 포함한다. 또한, 다른 에피솜계 벡터의 공급원, 예를 들어 효모 ARS, 아데노바이러스, SV40, 또는 BPV도 고려된다.
- [0117] 당업자는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 작제하기 위한 장비를 잘 갖추고 있다(문헌참조: 예를 들어, Maniatis *et al.*, 1988 and Ausubel *et al.*, 1994, 이 둘다는 본원에 참조로 인용된다).
- [0118] 벡터는 또한 유전자 전달 및/또는 유전자 발현을 추가로 조절하거나 다르게는 표적화된 세포에 유익한 성질을 제공하는 다른 성분 또는 기능을 포함할 수 있다. 상기 다른 성분은 예를 들어, 세포로의 결합 또는 표적화에 영향을 주는 성분들(세포-유형 또는 조직-특이적 결합을 매개하는 성분들을 포함하는); 벡터 핵산의 세포에 의한 취득에 영향을 주는 성분들; 취득 후 세포 내 폴리뉴클레오타이드의 위치화에 영향을 주는 성분들(핵 위치화를 매개하는 매개하는 제제들과 같은); 및 폴리뉴클레오타이드의 발현에 영향을 주는 성분들을 포함한다.
- [0119] 상기 성분들은 또한 핵산을 취득하고 벡터에 의해 전달된 핵산을 발현하는 세포를 검출하거나 선택하기 위해 사용될 수 있는 검출가능한 마커 및/또는 선택 마커와 같은 마커를 포함할 수 있다. 상기 성분들은 벡터의 천연 특성 (성분 또는 기능 매개 결합 및 취득을 갖는 특정 바이러스 벡터의 용도와 같은)으로서 제공되거나 벡터는 변형되어 상기 기능을 제공할 수 있다. 다양한 상기 벡터는 당업계에 공지되어 있고 일반적으로 가용하다. 벡터가 숙주 세포에 유지되는 경우, 상기 벡터는 숙주 세포의 게놈내에 혼입되어 있는 자율적 구조체로서 감수분열 동안에 세포에 의해 안정하게 복제될수 있거나 숙주 세포의 핵 또는 세포질에 유지될 수 있다.
- [0120] c. 트랜스포존 기반 시스템
- [0121] 특정 양상에서, 프로그래밍 인자의 전달은 트랜스포존-트랜스포사제 시스템을 사용할 수 있다. 예를 들어, 트랜스포존-트랜스포사제 시스템은 널리 공지된 슬리핑 뷰티 (Sleeping Beauty), 프로그 프린스 (Frog Prince) 트랜스포존-트랜스포사제 시스템(후자의 기재에 대해, 문헌(예를 들어 EP1507865)을 참조한다), 또는 TTAA-특이적 트랜스포존 PiggyBac 시스템일 수 있다.
- [0122] 트랜스포존은 전위로 불리우는 공정인, 단일 세포의 게놈내 상이한 위치로 주위를 이동할 수 있는 DNA 서열이다. 상기 공정에서, 이들은 돌연변이를 유발할 수 있고 게놈 내 DNA의 양을 변화시킬 수 있다. 트랜스포존은 또한 한때 점핑 유전자로서 호칭되었고 이동 유전학적 요소들의 예이다.
- [0123] 다양한 이동 유전학적 요소들이 있고 이들은 이들의 전위 기전을 기준으로 분류될 수 있다. 부류 I 이동 유전학적 요소들 또는 레트로트랜스포존은 이들 자체를 먼저 RNA로 전사되고 이어서 역전사효소에 의해 DNA로 역전사되고 게놈 내 또 다른 위치에 삽입됨에 의해 카피된다. 부류 II 이동 유전학적 요소들은 트랜스포사제를 사용하

여 하나의 위치로부터 또 다른 위치로 직접 이동하여 게놈 내에서 이들을 “절단하고 봉합한다”.

[0124] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용에 제공된 적체물(예를 들어, 다중-계통 작체물)은 PiggyBac 발현 시스템을 사용한다. PiggyBac (PB) DNA 트랜스포존은 “절단-및-봉합” 기전을 통해 이동함으로써 트랜스포존 자체에 의해 암호화된 트랜스포사제 효소 (PB 트랜스포사제)는 게놈 내 다른 부위에서 트랜스포존을 절개하고 재통합한다. PB 트랜스포사제는 특이적으로 트랜스포존을 플랭킹하는 PB 역위 말단 반복체 (ITR)을 인지하고; 이는 이들 서열에 결합하고 트랜스포존의 절개를 촉매한다. PB는 이어서 상대적으로 무작위 양상으로 게놈 전반에 걸쳐 TTAA 부위에서 통합한다. 유전자 트랩 돌연변이의 생성을 위해 (또는 유전자전이 동물을 생성하기 위해 적응된), 트랜스포사제는 하나의 플라스미드 상에 트랜스포 공급되고 공여자 트랜스포존을 함유하는 플라스미드로 동시 형질감염시키고, 재조합 트랜스포존은 트랜스포사제 (ITR)에 대한 결합 부위에 의해 플랭킹된 유전자 트랩을 포함한다. 트랜스포사제는 플라스미드로부터 트랜스포존의 절개 및 게놈으로의 후속적 통합을 촉매한다. 암호화 영역 내 통합은 유전자 트랩 발현을 위해 필요한 요소들을 포획한다. PB는 여러 이상적인 성질을 갖는다: (1) 이것은 우선적으로 유전자 내 삽입한다 (삽입의 50 내지 67%는 유전자를 히팅한다) (2) 이것은 어떠한 국소 호핑(hopping) (광범위 게놈 커버리지)이 없다 (3) 트랜스포사제의 상승된 수준이 감소된 전위를 유발하는 과생성 돌연변이에 민감하지 않다 4) 이것은 공여자 부위로부터 깨끗하게 절개하여 슬리핑 뷰티와 같이 않게 어떠한 “풋프린트”를 남기지 않는다.

[0125] d. 조절 요소들

[0126] 본원의 개시내용에 유용한 재프로그래밍 벡터에 포함된 발현 카세트는 바람직하게 (5'-에서-3' 방향으로) 단백질 암호화 서열에 작동적으로 연결된 진행 전사 프로모터, 삽입 서열을 포함하는 스플라이스 신호, 및 전사 종결/폴리아데닐화 서열을 함유한다.

[0127] (i) 프로모터/인핸서

[0128] 본원에 제공된 발현 작체물은 프로그래밍 유전자의 발현을 구동시키기 위해 프로모터를 포함한다. 프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 개시 부위를 위치시키는 기능을 하는 서열을 포함한다. 이의 최상의 공지된 예는 TATA 박스이지만, 예를 들어, 포유동물 종결 데옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라제 유전자에 대한 프로모터 및 SV40 레이트 유전자에 대한 프로모터와 같이 TATA 박스가 부재인 일부 프로모터에서, 개시 부위 자체 위에 위치한 구분된 요소는 개시 위치를 고정시키는 것을 도와준다. 추가의 프로모터 요소들은 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 개시 부위의 30-110 bp 업스트림 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터는 또한 개시 부위의 다운스트림에 기능성 요소들을 함유하는 것으로 나타났다. 암호화 서열을 프로모터 “의 제어하에” 있도록 하기 위해, 하나는 선택된 프로모터의 “다운스트림” (즉, 이의 3')에 전사 판독 프레임의 전사 개시 부위의 5' 말단에 위치한다. “업스트림” 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 RNA의 발현을 촉진시킨다.

[0129] 프로모터 요소들 사이의 공간은 흔히 가요성이어서 프로모터 기능은 요소들이 서로 상대적으로 역위되거나 이동되는 경우 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들 간의 공간은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp 이격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 의존하여, 이것은 개별 요소들이 전사를 활성화시키기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있음을 나타낸다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 관여하는 시스-작용 조절 서열을 언급하는 “인핸서”와 연계하여 사용되거나 사용되지 않을 수 있다.

[0130] 프로모터는 암호화 분절 및/또는 엑손의 업스트림에 위치한 5' 비-암호화 서열을 단리시킴에 의해 수득될 수 있는 바와 같이 핵산 서열과 천연적으로 연관된 것일 수 있다. 상기 프로모터는 “내인성”으로서 언급될 수 있다. 유사하게, 인핸서는 상기 서열의 다운스트림 또는 업스트림에 위치한, 핵산 서열과 천연적으로 연관된 것일 수 있다. 대안적으로, 특정 이점은 정상적으로 이의 천연 환경에서 핵산 서열과 연합되지 않은 프로모터 프로모터를 언급하는, 재조합 또는 이종성 프로모터의 제어하에 암호화 핵산 분절을 위치시킴에 의해 획득될 수 있다. 재조합 또는 이종성 인핸서는 또한 이의 천연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 연합되지 않은 인핸서를 언급한다. 상기 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 바이러스, 원핵 세포 또는 진핵 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인핸서, 및 “천연적으로 존재”하지 않는, 즉, 발현을 변화시키는 상이한 전사 조절 영역, 및/또는 돌연변이의 상이한 요소들을 함유하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 작체물에서 대부분 통상적으로 사용되는 프로모터는 β -락타마제 (페니실리나제), 락토스 및 트립토판 (trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 합성적으로 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 생성하는 것에 추가로, 서열은 본원에 기재된 조성물과 연계하여 PCR™을 포함하는 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생성될 수 있다(문헌참조: 미국 특허 제4,683,202호 및 제5,928,906호, 각각은 본원에 참조로 인용된다). 추가로, 미토콘드리아, 엽록체 등과 같은 비-핵 기관 내 서열의 전사 및/또는 발현을 지시하는

제어 서열이 또한 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

- [0131] 천연적으로, 기관(organelle), 세포 유형, 기관(organ), 또는 발현을 위해 선택된 유기체 내에서 DNA 분질의 발현을 효과적으로 지시하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요하다. 분자 생물학적 분야의 당업자는 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 유형 조합의 사용을 알고 있다(문헌참조: 예를 들어, Sambrook *et al.*, 1989, 본원에 참조로 인용됨). 사용되는 프로모터는 항상성, 조직-특이적, 유도성일 수 있고/있거나 도입된 DNA 분질의 고수준의 발현을 지시하기 위해 적당한 조건하에서 유용할 수 있고, 예를 들어, 재조합 단백질 및/또는 펩타이드의 대규모 생성에 유리하다. 프로모터는 이중성 또는 내인성일 수 있다.
- [0132] 추가로 임의의 프로모터/인핸서 조합(예를 들어, 진핵 세포 프로모터 데이터 베이스 EPDB 당)은 또한 발현을 구동시키기 위해 사용될 수 있다. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용은 또 다른 가능한 구현예이다. 진핵 세포는 적당한 세균 폴리머라제가 전달 복합체의 일부로서 또는 추가의 유전학적 발현 작제물의 일부로서 제공된 경우 특정 세균 프로모터로부터의 세포질 전사를 지지할 수 있다.
- [0133] 프로모터의 비제한적인 예는 어얼리 또는 레이트 바이러스 프로모터, 예를 들어, SV40 어얼리 또는 레이트 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 이메디에이트 어얼리 프로모터, 라우스 육종 바이러스 (RSV) 어얼리 프로모터; 진핵 세포 프로모터, 예를 들어, 베타 액틴 프로모터 (Ng, 1989; Quitsche *et al.*, 1989), GAPDH 프로모터 (Alexander *et al.*, 1988, Ercolani *et al.*, 1988), 메탈로티오네인 프로모터(Karin *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 1984); 및 연결된(concatenated) 반응 요소 프로모터들, 예를 들어, 사이클릭 AMP 반응 요소 프로모터들 (cre), 혈청 반응 요소 프로모터 (sre), 포르볼 (phorbol) 에스테르 프로모터 (TPA) 및 최소 TATA 박스 부근의 반응 요소 프로모터들 (tre)를 포함한다. 또한 사람 성장 호르몬 프로모터 서열(예를 들어, Genbank에 기재된 사람 성장 호르몬 최소 프로모터, 승인 번호 X05244, 뉴클레오타이드 283-341) 또는 마우스 유방 종양 프로모터(ATCC, Cat. No. ATCC 45007로부터 가용한)를 사용할 수 있다.
- [0134] 특히, 프로그래밍으로부터 유래된 조혈 세포 및 조혈 세포의 전구체에서 리포터 유전자 발현을 위한 조직-특이적 전이유전자 발현은 유래된 조혈 세포 및 전구체를 동정하기 위한 방식으로 바람직할 수 있다. 특이성 및 활성 둘다를 증가시키기 위해, 시스-작용 조절 요소들의 사용이 고려되었다. 예를 들어, 조혈 세포-특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 많은 조혈 세포-특이적 프로모터가 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 조혈 세포 유전자들의 프로모터가 표 1에 제공되어 있다.
- [0135] 특정 양상에서, 본 개시내용의 방법은 또한 인핸서 서열, 즉, 프로모터의 활성을 증가시키고 시스로 작용하고 이들의 배향과 무관하게 심지어 보다 상대적으로 긴 거리 (표적 프로모터로부터 수킬로베이스까지 이격되어 있는)에서 작용할 잠재력을 갖는 핵산 서열에 관한 것이다. 그러나, 인핸서 기능은 이들이 또한 소정의 프로모터에 근접하여 기능할 수 있으므로 필수적으로 상기 긴 거리에 제한되지 않는다.
- [0136] 많은 조혈 세포 프로모터 및 인핸서 서열이 동정되었고 본 발명의 방법에 유용할 수 있다. 하기 문헌을 참조한다: 예를 들어, 미국 특허 제5,556,954호; 미국 특허 출원 제20020055144호; 미국 특허 출원 제20090148425호.
- [0137] (ii) 개시 신호 및 연결된 발현
- [0138] 특정 개시 신호는 또한 암호화 서열의 효율적인 해독을 위해 본원의 개시내용에 제공된 발현 작제물에 사용될 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열을 포함한다. 외인성 해독 제어 신호는 ATG 개시 코돈을 포함하고 제공될 필요가 있을 수 있다. 당업자는 이를 용이하게 결정할 수 있고 필요한 신호를 제공할 수 있다. 개시 코돈은 전체 삽입체의 해독을 보장하기 위해 목적하는 암호화 서열의 판독 프레임과 “인 프레임”으로 있어야 한다는 것은 널리 공지되어 있다. 외인성 해독 제어 신호 및 개시 코돈은 천연이거나 합성일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 인핸서 요소들의 내포에 의해 증진될 수 있다.
- [0139] 특정 구현예에서, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 요소들을 사용하여 다중유전자, 또는 폴리시스트론 메시지를 생성한다. IRES 요소들은 5' 메틸화된 캡 의존성 해독의 리보솜 스캐닝 모델을 우회할 수 있고 내부 부위에서 해독을 개시할 수 있다(문헌참조: Pelletier and Sonenberg, 1988). 피코나바이러스 패밀리의 2개의 구성원 (소아마비 및 뇌척수수근염)으로부터의 IRES 요소들은 문헌 (참조: Pelletier and Sonenberg, 1988)에 기재되었고, 또한 포유동물 메시지에서부터의 IRES가 기재되어 있다(문헌참조: Macejak and Sarnow, 1991). IRES 요소들은 이중성 개방 판독 프레임에 연결될 수 있다. 다중 개방 판독 프레임은 함께 전사될 수 있고 각각은 IRES에 의해 분리되어 있고 폴리시스트론 메시지를 생성한다. IRES 요소에 의해, 각각의 개방 판독 프레임은 효율적인 해독을 위해 리보솜에 접근할 수 있다. 다중 유전자는 단일 메시지를 전사하기 위해 단일 프로모터/인핸서를 사용하여 효율적으로 발현될 수 있다(문헌참조: 미국 특허 제5,925,565호 및 제5,935,819호, 각각은 본원에 참조로 인용됨).

용된다).

[0140] 추가로, 특정 2A 서열 요소들을 사용하여 본원의 개시내용에 제공된 작제물 내 프로그래밍 유전자의 연결되거나 동시 발현을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 절단 서열을 사용하여 단일 시스템을 형성하기 위해 개방 판독 프레임들을 연결시킴에 의해 유전자들을 동시 발현시킬 수 있다. 예시적 절단 서열은 F2A (구체적 절단 바이러스 2A) 또는 “2A-유사” 서열(예를 들어, 토세아 아시그나 바이러스 2A; T2A)이다. 특정 구현예에서, F2A-절단 펩타이드를 사용하여 다중-계통 작제물 내 유전자들의 발현을 연결한다.

[0141] e. 복제 오리진

[0142] 숙주 세포 내 백터를 증가시키기 위해, 하나 이상의 복제 오리진 부위 (흔히 “ori” 로 칭함), 예를 들어, 상기된 바와 같이 EBV의 oriP 또는 프로그래밍에서 유사하거나 상승된 기능을 갖고, 유전학적으로 가공된 oriP에 상응하는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 상기된 바와 같이 다른 염색체의 복제 바이러스의 복제 오리진 또는 자발적으로 복제하는 서열 (ARS)가 사용될 수 있다.

[0143] f. 선택 및 스크리닝 가능한 마커

[0144] 특정 구현예에서, 핵산 작제물을 함유하는 세포는 발현 백터 내 마커를 포함시킴에 의해 시험관내 또는 생체내에서 동정될 수 있다. 상기 마커는 발현 백터를 함유하는 세포의 용이한 동정을 가능하게 하는 세포에 동정가능한 변화를 부여한다. 일반적으로, 선택 마커는 선택을 가능하게 하는 성질을 부여하는 마커이다. 양성 선택 마커는 마커의 존재가 이의 선택을 가능하게 하는 마커이고 음성 선택 마커는 이의 존재가 이의 선택을 차단시키는 마커이다. 양성 선택 마커의 예는 약물 내성 마커이다.

[0145] 일반적으로, 약물 선택 마커의 내포는 형질전환체의 클로닝 및 동정을 원조하고, 예를 들어, 네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 내성을 부여하는 유전자는 유용한 선택 마커이다. 조건의 수행을 기반으로 하는 형질전환체의 구별을 가능하게 하는 표현형을 부여하는 마커에 추가로, 스크리닝가능한 마커, 예를 들어, 이의 기반이 비색 분석인 GFP를 포함하는 다른 유형의 마커가 또한 고려된다. 대안적으로, 헤르페스 심플렉스 티미딘 키나제 (*tk*) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)와 같은 음성 선택 마커로서 스크리닝가능한 효소가 사용될 수 있다. 당업자는 또한 능히 FACS 분석과 연계된 면역학적 마커를 사용하는 방법을 알고 있다. 사용되는 마커는 이것이 유전자 생성물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현될 수 있는 한 중요한 것으로 사료되지 않는다. 선택 및 스크리닝 가능한 마커의 추가의 예는 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0146] 현재 개시내용과 함께 DNA 또는 RNA와 같은 핵산의 만능 줄기 세포로의 도입은 본원에 기재된 바와 같이 또는 당업자에게 공지되어 이는 바와 같이 세포의 형질전환을 위한 핵산 전달을 위해 임의의 적합한 방법을 사용할 수 있다. 상기 방법은 예를 들어, 생체의 형질감염에 의한(Wilson *et al.*, 1989, Nabel *et al.*, 1989), 주사에 의한(미국 특허 제5,994,624호, 제5,981,274호, 제5,945,100호, 제5,780,448호, 제5,736,524호, 제5,702,932호, 제5,656,610호, 제5,589,466호 및 제5,580,859호, 이의 각각은 본원에 참조로 인용된다)(이는 마이크로주사(Harland and Weintraub, 1985; 미국 특허 제5,789,215, 본원에 참조로 인용된다)를 포함함); 전기천공에 의해(미국 특허 제5,384,253호, 본원에 참조로 인용됨; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); 인산칼슘 침전에 의해(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); DEAE-텍스트란에 이어서 폴리에틸렌 글리콜을 사용함에 의해(Gopal, 1985); 직접적인 음파 로딩에 의해(Fechheimer *et al.*, 1987); 리포좀 매개된 형질감염(Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) 및 수용체-매개된 형질감염에 의해 (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988); 마이크로주진 충격에 의해(PCT Application Nos. WO 94/09699 and 95/06128; 미국 특허 제5,610,042호; 제5,322,783호, 제5,563,055호, 제5,550,318호, 제5,538,877호 및 제5,538,880호, 및 이의 각각은 본원에 참조로 인용됨); 탄화규소 섬유와 함께 진탕에 의해(Kaeppler *et al.*, 1990; 미국 특허 제5,302,523호 및 제5,464,765호, 이의 각각은 본원에 참조로 인용된다); 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개된 형질전환에 의해 (미국 특허 제5,591,616호 및 제5,563,055호, 각각은 본원에 참조로 인용됨); 건조/억제-매개된 DNA 취득에 의해(Potrykus *et al.*, 1985), 및 상기 방법의 임의의 조합과 같은 DNA의 직접적인 전달을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들과 같은 기술의 적용을 통해, 기관(들), 세포(들), 조직 (들) 또는 유기체(들)은 안정하게 또는 일시적으로 형질전환될 수 있다.

[0147] C. MHC 반수체형 매칭

[0148] 주요 조직적합성 복합체(MHC)는 동종이계 기관 이식의 면역 거부에 있어서 주된 요인이다. 3개의 주요 부류 I

MHC 반수체형 (A, B 및 C)과 3개의 주요 MHC 부류 II 반수체형 (DR, DP 및 DQ)이 존재한다. HLA 유전자좌는 매우 다형성이며, 6번 염색체 상에서 4 Mb에 걸쳐 분포되어 있다. 상기 영역 내에서 HLA 유전자를 반수체화시킬 수 있는 능력은 임상적으로 중요한데, 이는 상기 영역이 자가면역 및 감염성 질환과 연관이 있고 공여자와 수여자 간의 HLA 반수체형에 대한 상용성은 이식의 임상적 결과에 영향을 줄 수 있기 때문이다. MHC 부류 I에 상응하는 HLA는 세포 내부로부터의 펩타이드를 T-림프구에 제공하고, MHC 부류 II에 상응하는 HLA는 세포의 외부로부터의 항원을 T-림프구에 제공한다. 이식편과 숙주간의 MHC 반수체형의 비상용성은 이식편에 대한 면역 반응을 촉발시켜 이에 대한 거부로 이어지게 한다. 따라서, 환자는 이식 거부 반응을 방지하기 위해 면역억제제로 치료될 수 있다. HLA-매칭된 줄기 세포주는 면역 거부 반응의 위험을 극복할 수 있다.

[0149] 이식에 있어서 HLA의 중요성 때문에, HLA 유전자좌는 일반적으로 선호될 수 있는 공여자-수여자 쌍을 확인하기 위한 혈청학 및 PCR에 의해 분류된다. HLA 부류 I 및 II 항원의 혈청학적 검출은 정제된 T 또는 B 림프구를 이용하는 보체 매개된 림프구독성 시험을 사용하여 성취될 수 있다. 이 절차는 HLA-A 및 -B 유전자좌를 매칭하는데 주로 사용된다. 분자 기반의 조직 유형 분류는 혈청학적 검사에 비해 더 정확한 경우가 많을 수 있다. 저해상도 분자적 방법, 예를 들어, PCR 생성물이 일련의 올리고뉴클레오타이드 프로브에 대해 시험되는 SSOP (서열 특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브) 방법은 HLA 항원을 확인하는데 사용되며, 현재 이러한 방법들이 부류 II-HLA 분류에 사용되는 가장 흔한 방법이다. 고해상도 기법, 예를 들어, PCR 증폭을 위한 프라이머에 특이적인 대립유전자를 이용하는 SSP (서열 특이적 프라이머) 방법은 특이적인 MHC 대립유전자를 확인할 수 있다.

[0150] 공여자와 수여자간의 MHC 상용성은, 공여자 세포가 HLA 동종접합성, 즉 각 항원 제시 단백질에 대해 동일한 대립유전자를 포함하는 경우에 크게 증가한다. 대부분의 개체들은 MHC 클래스 I 및 II 유전자에 대해 이종접합성이지만, 어떤 개체들은 이러한 유전자들에 대해 동종접합성이다. 이러한 동종접합성 개체들은 초 공여자로서 기능할 수 있으며, 이들의 세포로부터 생성된 이식편은 해당 반수체형에 대해 동종접합성 또는 이종접합성인 모든 개체에 이식될 수 있다. 게다가, 동종접합성 공여자 세포가 한 집단에서 높은 빈도로 발견되는 반수체형을 보유하는 경우, 이러한 세포들은 다수의 개체들을 위한 이식 요법에 적용할 수 있다.

[0151] 따라서, 일부 구현예에서, 본 방법의 PSC는 치료될 대상체, 또는 환자의 것과 동일하거나 실질적으로 동일한 HLA 유형을 갖는 또 다른 대상체로부터 생성될 수 있다. 하나의 경우에 있어서, 공여자의 주요 HLA (예를 들어, HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR의 3개의 주요 유전자좌)는 수용자의 주요 HLA와 동일하다. 일부 경우에, 체세포 공여자는 슈퍼 공여자일 수 있고; 따라서, MHC 동종접합성 슈퍼 공여자로부터 유래된 PSC를 사용하여 HPC, 및 후속적으로 면역 세포, 예를 들어, T 세포를 생성할 수 있다. 따라서, 초 공여자에서 유래한 면역 이펙터 세포는 해당 반수체형에 대해 동종접합성 또는 이종접합성인 대상체에 이식될 수 있다. 예를 들어, 면역 세포는 2개의 HLA 대립유전자, 예를 들어, HLA-A 및 HLA-B에 동종접합성일 수 있다. 이와 같이, 초 공여자로부터 제조된 면역 세포는 다수의 잠재적인 수용자들과 잠재적으로 “매칭” 할 수 있는 면역 세포를 생성하기 위한 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다.

[0152] D. 유전학적으로 가공된 항원성 수용체

[0153] PSC는 가공된 TCR 또는 CAR과 같은 항원 수용체를 발현하기 위해 유전학적으로 가공될 수 있다. 예를 들어, PSC (예를 들어, 자가 또는 동종이계)는 암 항원에 대한 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 CAR을 발현하도록 변형된다.

[0154] 변형을 위한 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 문헌(Sambrook and Ausubel)을 참조한다. 예를 들어, 세포는 문헌(참조: Heemskerk *et al.* *Hum Gene Ther.* 19:496-510 (2008) and Johnson *et al.* *Blood* 114:535-46 (2009))에 기재된 형질도입 기술을 사용하여 암 항원에 대한 항원 특이성을 갖는 TCR을 발현하도록 형질도입될 수 있다.

[0155] 전장 TCR α 및 β (또는 γ 및 δ)쇄를 암호화하는 RNA의 전기천공은 레트로바이러스적으로 형질도입되고 내인성 TCR쇄의 쌍 형성에 의해 유발된 자가반응성을 갖는 장기간의 문제점을 극복하기 위한 대안으로서 사용될 수 있다. 상기 대안적 쌍형성이 일시적 형질감염 전략에서 일어나지만, 능히 생성된 자가반응성 T 세포는 일부 시간 후 자가반응성을 상실하는데 그 이유는 형질도입된 TCR α 및 β 쇄가 단지 일시적으로 발현되기 때문이다. 도입된 TCR α 및 β 쇄 발현이 감소되는 경우, 단지 정상의 자가 T 세포를 잔류시킨다. 이것은 전장 TCR쇄가 도입된 TCR쇄를 결코 상실하지 않아 환자에서 일정한 해당 자가반응성을 유발하는 안정한 레트로바이러스 형질도입에 의해 도입되는 경우가 아니다.

[0156] 일부 구현예에서, 상기 세포는 하나 이상의 항원 수용체를 암호화하는 유전학적 가공을 통해 도입된 하나 이상의 핵산, 및 상기 핵산의 유전학적으로 가공된 생성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 즉, 통상적으로 가

공된 세포 및/또는 상기 세포가 유래되는 유기체에서 발견되지 않는, 또 다른 유기체 또는 세포로부터 수득된 것과 같이 세포로부터 수득된 세포 또는 샘플 중에 존재하지 않는 이중성이다. 일부 구현예에서, 핵산은 천연적으로 존재하지 않는, 예를 들어, 천연에서 발견되지 않는 핵산(예를 들어, 키메라)이다.

[0157] 일부 구현예에서, CAR은 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 항원-인지 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원은 세포 표면 상에서 발현되는 단백질이다. 일부 구현예에서, CAR은 TCR-유사 CAR이고 상기 항원은 가공된 펩타이드 항원, 예를 들어, TCR과 같이 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자와 관련하여 세포 표면 상에서 인지되는 세포내 단백질의 펩타이드 항원이다.

[0158] CAR 및 재조합 TCR을 포함하는 예시적 항원 수용체, 및 수용체를 세포에 가공하고 도입하기 위한 방법은 예를 들어, 문헌(참조: 국제 특허 출원 공개 공보 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, 미국 특허 출원 공개 공보 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 제6,451,995호, 제7,446,190호, 제8,252,592호, 제8,339,645호, 제8,398,282호, 제7,446,179호, 제6,410,319호, 제7,070,995호, 제7,265,209호, 제7,354,762호, 제7,446,191호, 제8,324,353호, 및 제8,479,118호, 및 유럽 특허 출원 EP2537416)에 기재된 것들, 및/또는 문헌(참조: Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75)에 기재된 것들을 포함한다. 일부 양상에서, 유전학적으로 가공된 항원 수용체는 미국 특허 제7,446,190호에 기재된 바와 같은 CAR, 및 국제 특허 출원 공개 공보 WO/2014055668 A1에 기재된 것들을 포함한다.

[0159] 1. 키메라 항원 수용체

[0160] 일부 구현예에서, CAR은 다음을 포함한다: a) 세포내 신호전달 도메인, b) 막관통 도메인, 및 c) 항원 결합 영역을 포함하는 세포의 도메인.

[0161] 일부 구현예에서, 가공된 항원 수용체는 활성화 또는 자극 CAR, 동시 자극 CAR (문헌참조: WO2014/055668), 및/또는 억제 CAR (iCAR, 문헌(Fedorov *et al.*, 2013)을 참조한다)을 포함하는 CAR을 포함한다. CAR은 일반적으로 일부 양상에서 링커 및/또는 막관통 도메인(들)을 통해 하나 이상의 세포내 신호전달 성분에 연결된 세포의 항원 (또는 리간드) 결합 도메인을 포함한다. 상기 분자는 전형적으로 통상의 항원 수용체를 통한 신호, 동시 자극 수용체와 조합된 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 단독의 동시 자극 수용체를 통한 신호를 모방하거나 근접한다.

[0162] 본원의 개시내용의 특정 구현예는 세포내 신호전달 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 신호전달 모티프를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는, 면역원성을 감소시키기 위해 사람화된 CAR (hCAR)을 포함하는 항원-특이적 CAR 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는, 핵산의 용도에 관한 것이다. 특정 구현예에서, CAR은 하나 이상의 항원 간의 공유된 공간을 포함하는 에피토프를 인지할 수 있다. 특정 구현예에서, 결합 영역은 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역, 모노클로날 항체의 가변 영역 및/또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 특이성은 수용체에 결합하는 펩타이드 (예를 들어, 사이토킨)로부터 유래한다.

[0163] 사람 CAR 핵산은 사람 환자에 대한 세포성 면역치료요법을 증진시키기 위해 사용되는 사람 유전자들일 수 있는 것으로 고려된다. 특이적 구현예에서, 본 발명은 전장 CAR cDNA 또는 암호화 영역을 포함한다. 항원 결합 영역 또는 도메인은 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 제7,109,304호에 기재된 것들과 같은 특정 사람 모노클로날 항체로부터 유래된 단일쇄 가변 단편 (scFv)의 V_H 및 V_L 쇄의 단편을 포함할 수 있다. 상기 단편은 또한 사람 항원-특이적 항체의 임의의 수의 상이한 항원 결합 도메인일 수 있다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 단편은 사람 세포에서 발현을 위한 사람 코돈 용법을 위해 최적화된 서열에 의해 암호화된 항원-특이적 scFv이다.

[0164] 정렬은 다량체성, 예를 들어, 디아바디 또는 다량체일 수 있다. 다량체는 경쇄 및 중쇄의 가변부의 가교 결합쌍에 의해 디아바디로 형성될 가능성이 높다. 작제물의 힌지 부분은 전체적으로 결실되고, 제1 시스테인이 유지되고, 세린 보다는 프롤린 치환, 제1 시스테인까지 절단된 다중 대안물을 가질 수 있다. Fc 단백질은 결실될 수 있다. 안정하고/하거나 이량체화하는 임의의 단백질은 상기 목적에 작용할 수 있다. Fc 도메인, 예를 들어, 사람 면역글로불린으로부터의 CH2 또는 CH3 도메인 중 단지 하나를 사용할 수 있다. 또한, 이량체화를 개선시키기 위해 변형된 사람 면역글로불린의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 사용할 수 있다. 또한 단지 면역글로불린의 힌지 부분을 사용할 수 있다. 또한 CD8알파의 일부를 사용할 수 있다.

[0165] 일부 구현예에서, CAR 핵산은 막관통 도메인 및 변형된 CD28 세포내 신호전달 도메인과 같은, 다른 동시자극 수용체를 암호화하는 서열을 포함한다. 다른 동시자극 수용체는 하나 이상의 CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10,

및 4-1BB (CD137)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. CD3에 의해 개시된 원발성 신호에 추가로, 사람 CAR에 삽입된 사람 동시 자극 수용체에 의해 제공된 추가의 신호는 NK 세포의 완전한 활성화를 위해 중요하고 입양 면역요법의 생체내 지속성 및 치료학적 성공의 개선을 도와줄 수 있다.

- [0166] 일부 구현예에서, 입양 치료요법에 의해 표적화될 특정 세포 유형에서 발현되는 항원, 예를 들어, 암 마커 및/또는 약화된 반응을 유도하기 위해 의도된 항원, 예를 들어, 정상 또는 비-환부 세포 유형 상에 발현되는 항원과 같은 특정 항원 (또는 마커 또는 리간드)에 대한 특이성을 갖는 CAR이 작제된다. 따라서, CAR은 전형적으로 세포의 부분에서, 하나 이상의 항원 결합 분자, 예를 들어, 하나 이상의 항원 결합 단편, 도메인, 또는 이의 일부, 또는 하나 이상의 항체 가변 도메인, 및/또는 항체 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 모노클로날 항체 (mAb)의 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL)로부터 유래된 단일쇄 항체 단편 (scFv)와 같은 항에 분자의 항원 결합 부분 또는 부분들을 포함한다.
- [0167] 키메라 항원 수용체의 특정 구현예에서, 수용체의 항원 특이적 부분(이는 항원 결합 영역을 포함하는 세포의 도메인으로서 언급될 수 있다)은 종양 관련 항원 또는 병원체-특이적 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원은 패턴-인지 수용체, 예를 들어, 덱틴(Dectin)-1에 의해 인지되는 탄수화물 항원을 포함한다. 종양 관련 항원은 이것이 종양 세포의 세포 표면 상에서 발현되는 한 임의의 종류일 수 있다. 종양 관련 항원의 예시적 구현예는 CD19, CD20, 암배아 항원, 알파페토단백질, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, 상피 종양 항원, 흑색종-관련 항원, 머스타드 p53, 돌연변이된 ras 등을 포함한다.
- [0168] 키메라 수용체를 암호화하는 개방 관독 프레임의 존재는 게놈 DNA 공급원, cDNA 공급원으로부터 수득될 수 있거나 합성되거나 (예를 들어, PCR을 통해) 이의 조합일 수 있다. 게놈 DNA의 크기 및 인트론의 수에 의존하여, 인트론이 mRNA를 안정화시키는 것으로 밝혀짐에 따라 cDNA 또는 이의 조합을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 추가로, mRNA를 안정화시키기 위해 내인성 또는 외인성 비-암호화 영역을 사용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0169] 키메라 작제물은 누출된 DNA로서 또는 적합한 벡터에서 면역 세포로 도입될 수 있는 것으로 고려된다. 세포를, 누출된 DNA를 사용하는 전기천공에 의해 안정하게 형질감염시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,410,319호를 참조한다. 누출된 DNA는 일반적으로 발현을 위한 적당한 배향에서 플라스미드 발현 벡터 내 함유된, 키메라 수용체를 암호화하는 DNA를 언급한다.
- [0170] 대안적으로, 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터)를 사용하여 키메라 작제물을 면역 세포에 도입할 수 있다. 본원의 개시내용의 방법에 따라 사용하기 위해 적합한 벡터는 면역 세포에서 비-복제성이다. 바이러스를 기반으로 하는 다수의 벡터가 공지되어 있고, 여기서, 세포에 유지되는 바이러스의 카피수는 세포의 생존능을 유지하기에 충분히 낮고, 예를 들어, HIV, SV40, EBV, HSV, 또는 BPV를 기반으로 하는 벡터가 있다.
- [0171] 일부 양상에서, 항원-특이적 결합, 또는 인지 성분은 하나 이상의 막관통 및 세포내 신호전달 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, CAR은 CAR의 세포의 도메인에 융합된 막관통 도메인을 포함한다. 하나의 구현예에서, 천연적으로 CAR 내 도메인 중 하나와 결합된 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인으로 도메인의 결합을 회피하도록 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형된다.
- [0172] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 천연으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래한다. 공급원이 천연인 경우, 일부 양상에서 도메인은 임의의 막 결합된 또는 막관통 단백질로부터 유래한다. 막관통 영역은 T-세포 수용체, CD28, CD3 제타, CD3 엡실론, CD3 감마, CD3 델타, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D, 및 DAP 분자의 알파, 베타, 또는 제타 채로부터 유래된 것들(즉, 이의 적어도 막관통 영역(들)을 포함하는)을 포함한다. 대안적으로, 일부 구현예에서 막관통 도메인은 합성이다. 일부 양상에서, 합성 막관통 도메인은 주로 소수성 잔기들, 예를 들어, 류신 및 발린을 포함한다. 일부 양상에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛은 합성 막관통 도메인의 말단에서 발견된다.
- [0173] 특정 구현예에서, NK 세포와 같은 면역 세포를 유전학적으로 변형시키기 위해 본원에 기재된 플랫폼 기술은 (i) 전기천공 장치 (예를 들어, 뉴클레오펙터를 사용한 비-바이러스 유전자 전달, (ii) 엔도도메인(예를 들어, CD28/CD3- ζ , CD137/CD3- ζ , 또는 다른 조합)을 통해 신호를 전달하는 CAR, (iii) 항원-인지 도메인을 세포 표면으로 연결하는 다양한 길이의 세포외 도메인을 갖는 CAR 및 일부 경우에, (iv) CAR⁺ 면역 세포를 강하게 및 수적으로 확장시킬 수 있도록 K562로부터 유래된 인공 항원 제공 세포 (aAPC)(문헌참조: Singh *et al.*, 2008;

Singh *et al.*, 2011)를 포함한다.

[0174] 2. T 세포 수용체 (TCR)

[0175] 일부 구현예에서, 유전학적으로 가공된 수용체는 재조합 TCR 및/또는 천연적으로 존재하는 T 세포로부터 클로닝된 TCR을 포함한다. "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 가변 α 및 β 쇠 (또한 각각 TCR α 및 TCR β 로서 공지된) 또는 가변 γ 및 δ 쇠 (또한 각각 TCR γ 및 TCR δ 로서 공지된)를 함유하고 MHC 수용체에 결합된 항원 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 분자를 언급한다. 일부 구현예에서, TCR은 $\alpha\beta$ 형태이다.

[0176] 전형적으로, $\alpha\beta$ 및 $\gamma\delta$ 형태로 존재하는 TCR은 일반적으로 구조적으로 유사하지만 이들을 발현하는 T 세포는 고유의 해부학적 위치 또는 기능을 가질 수 있다. TCR은 세포의 표면 상에서 또는 가용성 형태로 발견될 수 있다. 일반적으로, TCR은 T 세포 (또는 T 림프구)의 표면상에서 발견되고, 여기서, 이것은 일반적으로 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합된 항원을 인지하는데 관여한다. 일부 구현예에서, TCR은 또한 불변 도메인, 막관통 도메인 및/또는 짧은 세포질 꼬리를 함유할 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997). 예를 들어, 일부 양상에서, TCR의 각각의 쇠는 하나의 N-말단 면역글로불린 가변 도메인, 하나의 면역글로불린 불변 도메인, 막관통 영역 및 C-말단에 짧은 세포질 꼬리를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 신호 전달을 매개하는데 관여하는 CD3 복합체의 영구적 단백질과 연관된다. 달리 기재되지 않는 경우, 용어 "TCR"은 이의 기능성 TCR 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야만 한다. 상기 용어는 또한 $\alpha\beta$ 형태 또는 $\gamma\delta$ 형태의 TCR을 포함하는, 온전하거나 전장의 TCR를 포괄한다.

[0177] 따라서, 본원의 목적을 위해, TCR에 대한 언급은 임의의 TCR 또는 MHC 분자, 즉, MHC-펩타이드 복합체에 결합된 특이적 항원 펩타이드에 결합하는 TCR의 항원-결합 부분과 같은 기능성 단편을 포함한다. 상호교환적으로 사용될 수 있는 "항원 결합 부분" 또는 항원 결합 단편"은 TCR의 구조적 도메인의 일부를 함유하지만 완전한 TCR이 결합하는 항원(예를 들어, MHC-펩타이드 복합체)에 결합하는 분자를 언급한다. 일부 경우에, 항원 결합 부분은 TCR의 가변 도메인, 예를 들어, 특정 MHC-펩타이드 복합체에 결합하는 것에 대한 결합 부위를 형성하기에 충분한 TCR의 가변 α 쇠 및 가변 β 쇠와 같은 TCR의 가변 도메인을 함유하고, 여기서, 각각의 쇠는 3개의 상보성 결정 영역을 함유한다.

[0178] 일부 구현예에서, TCR 쇠의 가변 도메인은 연합하여 TCR 분자의 결합 부위를 형성함에 의해 항원 인지를 부여하고 펩타이드 특이성을 결정하는, 면역글로불린과 유사한 루프 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 형성한다. 전형적으로, 면역글로불린과 같이, CDR은 프레임워크 영역 (FR)에 의해 분리된다(문헌참조: 예를 들어, Jores *et al.*, 1990; Chothia *et al.*, 1988; Lefranc *et al.*, 2003). 일부 구현예에서, CDR3은 가공된 항원을 인지하기 위해 관여하는 주요 CDR이지만, 알파 쇠의 CDR1은 또한 항원성 펩타이드의 N-말단부와 상호작용하는 것으로 나타난 반면 베타 쇠의 CDR1은 펩타이드의 C-말단부와 상호작용한다. CDR2는 MHC 분자를 인지하는 것으로 사료된다. 일부 구현예에서, β -쇠의 가변 영역은 추가로 초가변 (HV4) 영역을 함유할 수 있다.

[0179] 일부 구현예에서, TCR 쇠는 불변 도메인을 함유한다. 예를 들어, 면역글로불린과 같이, TCR 쇠(예를 들어, α -쇠, β -쇠)의 세포의 부분은 N-말단에서 2개의 면역글로불린 도메인, 가변 도메인 (예를 들어, V_α 또는 V_β ; 전형적으로 캐뻛 넘버링을 기준으로 아미노산 1 내지 116: Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.), 및 세포막에 인접한 하나의 불변 도메인(예를 들어, α -쇠 불변 도메인 또는 C_α , 전형적으로 캐뻛을 기준으로 아미노산 117 내지 259, β -쇠 불변 도메인 또는 C_β , 전형적으로 캐뻛을 기준으로 아미노산 117 내지 295)를 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 2개의 쇠에 의해 형성되는 TCR의 세포의 부분은 CDR을 함유하는, 2개의 막-근접 불변 도메인 및 2개의 막-원위 가변 도메인을 함유한다. TCR 도메인의 불변 도메인은 짧은 연결 서열을 함유하고, 여기서, 시스테인 잔기는 디설파이드 결합을 형성하고 이는 2개의 쇠 사이를 연결한다. 일부 구현예에서, TCR은 α 및 β 쇠 각각에서 추가의 시스테인 잔기를 가져 TCR은 불변 도메인에서 2개의 디설파이드 결합을 함유한다.

[0180] 일부 구현예에서, TCR 쇠는 막관통 도메인을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 양으로 하전되어 있다. 일부 경우에서, TCR 쇠는 세포질 꼬리를 함유한다. 일부 경우에, 상기 구조는 TCR이 CD3과 같은 다른 분자와 연합할 수 있게 한다. 예를 들어, 막관통 영역을 갖는 불변 도메인을 함유하는 TCR은 세포막에 단백질을 고정시키고 CD3 신호전달 장치 또는 복합체의 영구 서브유닛과 연합할 수 있다.

[0181] 일반적으로, CD3은 포유동물 및 ζ -쇄에서 3개의 고유 쇠(γ , δ , 및 ϵ)를 가질 수 있는 다중-단백질 복합체이다. 예를 들어, 포유동물에서, 복합체는 CD3 γ 쇠, CD3 δ 쇠, 2개의 CD3 ϵ 쇠 및 CD3 ζ 쇠의 동종이량체를 함유할 수 있다. CD3 γ , CD3 δ , 및 CD3 ϵ 쇠는 단일 면역글로불린 도메인을 함유하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 고도의 관련 세포 표면 단백질이다. CD3 γ , CD3 δ , 및 CD3 ϵ 쇠의 막관통 영역은 음으로 하전되어 있고, 이들 쇠가 양으로 하전된 T 세포 수용체 쇠와 연합하도록 하는 특징이다. CD3 γ , CD3 δ , 및 CD3 ϵ 쇠의 세포내 꼬리 각각은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 공지된 단일의 보존된 모티프를 함유하는 반면 각각의 CD3 ζ 쇠는 3개를 갖는다. 일반적으로, ITAM은 TCR 복합체의 신호전달 능력에 관여한다. 이들 악세서리 분자는 음으로 하전된 막관통 영역을 갖고 TCR로부터 세포로 신호를 전파하는 역할을 수행한다. CD3- 및 ζ -쇄는 TCR과 함께 T 세포 수용체 복합체로서 공지된 것을 형성한다.

[0182] 일부 구현예에서, TCR은 2개의 쇠 α 및 β (또는 임의로 γ 및 δ)의 이종이량체일 수 있거나 이것은 단일쇄 TCR 작제물일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 예를 들어, 디설파이드 결합 또는 다설파이드 결합들에 의해 연결된 2개의 별개의 쇠 (α 및 β 쇠 또는 γ 및 δ 쇠)를 함유하는 이종이량체이다. 일부 구현예에서, 표적 항원 (예를 들어, 암 항원)에 대한 TCR을 동정하고 세포에 도입한다. 일부 구현예에서, TCR을 암호화하는 핵산은 예를 들어, 대중에게 가용한 TCR DNA 서열의 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 증폭 (PCR)에 의해 다양한 공급원으로 부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 생물학적 공급원으로부터, 예를 들어, T 세포 (예를 들어, 세포독성 T 세포), T 세포 하이브리도마 또는 다른 대중에게 가용한 공급원과 같은 세포로부터 수득된다. 일부 구현예에서, T 세포는 생체내 단리된 세포로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 고친화성 T 세포 클론은 환자로부터 단리될 수 있고 TCR이 단리된다. 일부 구현예에서, T 세포는 배양된 T 세포 하이브리도마 또는 클론일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 항원에 대한 TCR 클론은 사람 면역계 유전자 (예를 들어, 사람 백혈구 항원 시스템 또는 HLA)로 가공된 유전자전이 마우스에서 생성되었다. 일부 구현예에서, 파아지 디스플레이는 표적 항원에 대한 TCR을 단리하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, TCR 또는 이의 항원-결합 부분은 합성적으로 TCR의 서열 지식으로부터 합성적으로 생성될 수 있다.

[0183] 3. 항원-제공 세포

[0184] 대식세포, B 림프구 및 수지상 세포를 포함하는 APC는 이들의 특정 MHC 분자의 발현으로 구분된다. APC는 이들의 외부 세포막 상에 MHC 분자와 함께 항원을 내재화하고 상기 항원의 일부를 재발현한다. 상기 MHC는 다중 유전자좌와 함께 대형 유전학적 복합체이다. MHC 유전자좌는 부류 I 및 부류 II MHC로서 언급되는 2개 부류의 MHC 막 분자를 암호화한다. T 헬퍼 림프구는 일반적으로 MHC 부류 II 분자와 연합된 항원을 인지하고, T 세포독성 림프구는 MHC 부류 I 분자와 연합된 항원을 인지한다. 사람에서, MHC는 HLA 복합체로서 언급되고 마우스에서 H-2 복합체로서 언급된다.

[0185] 일부 경우에, aAPC는 구현예의 치료학적 조성물 및 세포 치료요법 생성물을 제조하는데 유용하다. 항원-제공 시스템의 제조 및 용도에 관한 일반 지침에 대해서, 예를 들어, 미국 특허 제6,225,042호, 제6,355,479호, 제6,362,001호 및 제6,790,662호를 참조한다.

[0186] aAPC 시스템은 적어도 하나의 외인성 원조 분자를 포함할 수 있다. 분자를 원조하는 임의의 적합한 수 및 조합이 사용될 수 있다. 원조 분자는 동시-자극 분자와 접착 분자와 같은 원조 분자로부터 선택될 수 있다. 예시적인 동시-자극 분자는 CD86, CD64 (Fc γ RI), 41BB 라간드, 및 IL-21을 포함한다. 접착 분자는 탄수화물-결합 당단백질, 예를 들어, 셀렉틴, 막관통 결합 당단백질, 예를 들어, 인테그린, 칼슘-의존성 단백질, 예를 들어, 카드헤린, 및 단일-통과 막관통 면역글로불린 (ig) 슈퍼패밀리 단백질, 예를 들어, 예를 들어, 세포 대 세포 또는 세포 대 매트릭스 접촉을 촉진시키는 간 접착 분자 (ICAM)를 포함할 수 있다. 예시적 접착 분자는 LFA-3 및 ICAM, 예를 들어 ICAM-1을 포함한다. 동시-자극 분자 및 접착 분자를 포함하는, 예시적인 원조 분자의 선택, 클로닝, 제조 및 발현을 위해 유용한 기술, 방법 및 시약은 예를 들어, 미국 특허 제6,225,042호, 제6,355,479호, 및 제6,362,001호에 예시되어 있다.

[0187] 4. 항원

[0188] 유전학적으로 가공된 항원 수용체에 의해 표적화된 항원들 중에는 입양 세포 치료요법을 통해 표적화될 질환, 병태 또는 세포 유형과 관련하여 발현되는 것들이다. 질환 및 병태 중에는 혈액암, 면역계의 암, 예를 들어, 림프종, 백혈병 및/또는 골수종, 예를 들어, B, T, 및 골수 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종을 포함하는, 암 및 종양을 포함하는 증식성, 신생물성 및 악성 질환 및 병태들이 있다. 일부 구현예에서, 상기 항원은 정상 또는 비-표적화된 세포 또는 조직과 비교하여 질환 또는 병태의 세포, 예를 들어, 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/되거나 가공된 세포 상

에서 발현된다.

- [0189] 임의의 적합한 항원은 본원의 방법에 사용될 수 있다. 예시적인 항원은 감염성 제제로부터의 항원 분자, 자동-/자가-항원, 종양-/암-연합된 항원, 및 종양 신생항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다(문헌참조: Linnemann *et al.*, 2015).
- [0190] 종양-관련 항원은 전립선, 유방, 결장직장, 폐, 췌장, 신장, 악성종괴종, 난소 또는 흑색종 암으로부터 유래할 수 있다. 예시적인 종양 관련 항원 또는 종양 세포 유래된 항원은 MAGE 1, 3, 및 MAGE 4 (또는 다른 MAGE 항원); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (또한 NY-ESO-1으로서 공지된); SAGE; 및 HAGE 또는 GAGE를 포함한다. 종양 항원의 이들 비제한적인 예는 흑색종, 폐 암종, 육종 및 방광암종과 같은 광범위한 종양 유형에서 발현된다. 예를 들어, 미국 특허 제6,544,518호를 참조한다. 전립선 암 종양-관련 항원은 예를 들어, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 전립선-특이적 항원 (PSA), 전립선 산 포스페이트, NKX3.1, 및 전립선의 6개 막관통 상피 항원(STEAP)을 포함한다.
- [0191] 다른 종양 관련 항원은 Plu-1, HASH-1, HashH-2, Cripto 및 Criptin을 포함한다. 추가로, 종양 항원은 많은 암의 치료에 유용한, 짧은 10개 아미노산 길이의 펩타이드인 전장 고나도트로핀 호르몬 방출 호르몬 (GnRH)과 같은 자가 펩타이드 호르몬일 수 있다.
- [0192] 종양 항원은 종양-관련 항원 발현, 예를 들어, HER-2/neu 발현을 특징으로 하는 암으로부터 유래된 종양 항원을 포함한다. 관심 대상의 종양 관련 항원은 멜라닌세포-흑색종 계통 항원 MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, 티로시나제 및 티로시나제 관련 단백질과 같은 계통 특이적 종양 항원을 포함한다. 예시적인 종양-관련 항원은 p53, Ras, c-Myc, 세포질 세린/트레오닌 키나제 (예를 들어, A-Raf, B-Raf, 및 C-Raf, 사이클린-의존성 키나제), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, 티로시나제, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, 포스포이노시티드 3-키나제(PI3K), TRK 수용체, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, 빌름스 종양 항원(Wilms' tumor antigen) (WT1), AFP, -카테닌 /m, 카스파제-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, Gnt-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, 미오신/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, 아넥신 II, CDC27/m, TPI/mbcr-ab1, BCR-ABL, 인터페론 조절 인자 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, 종양 관련 칼슘 신호 전달인자 1 (TACSTD1) TACSTD2, 수용체 티로신 키나제(예를 들어, 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) (특히, EGFRvIII), 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR)), 세포질 티로신 키나제(예를 들어, src-패밀리, syk-ZAP70 패밀리), 인테그린-연결된 키나제(ILK), 신호 전달인자 및 전사 STAT3, STATS, 및 STATE의 신호 전달인자 및 활성화인자(예를 들어, HIF-1 및 HIF-2), 핵 인자 -카파 B (NF-B), 노치 수용체(예를 들어, 노치1-4), c-Met, 라파마이신의 포유동물 표적(mTOR), WNT, 세포의 신호 조절된 키나제 (ERK), 및 이들의 조절 서브유닛, PMSA, PR-3, MDM2, 메소텔린, 신장 세포 암종-5T4, SM22-알파, 카보닉 언하이드라제 I (CAI) 및 IX (CAIX) (또한 G250로서 공지된), STEAD, TEL/AML1, GD2, 프로테이나제 3, hTERT, 육종 전좌 중지점(breakpoint), EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, ALK, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, 폴리시일산, MYCN, RhoC, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔리안, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoBoH, NY-BR-1, RGSs, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레구마인, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, fos 관련 항원 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1 및 유전자형 중 임의의 하나 이상으로부터 유래되거나 이들을 포함하는 종양 항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0193] 항원은 종양 세포에서 돌연변이된 유전자로부터 또는 정상 세포와 비교하여 종양 세포에서 상이한 수준으로 전사되는 유전자로부터 유래된 에피토프 영역 또는 에피토프 펩타이드, 예를 들어, 텔로머라제 효소, 수르비빈, 메소텔린, 돌연변이된 ras, bcr/abl 재배열, Her2/neu, 돌연변이된 또는 야생형 p53, 시토크롬 P450 1B1, 및 비정상적으로 발현된 인트론 서열, 예를 들어, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제-V; 흑색종 및 B-세포 림프종에서 특유의 유전자형을 생성하는 면역글로불린 유전자의 클론 재정렬; 발암바이러스 공정으로부터 유래된 에피토프 영역 또는 에피토프 펩타이드를 포함하는 종양 항원, 예를 들어, 사람 파필로마 바이러스 단백질 E6 및 E7; 엡슈타인 바르 바이러스 단백질 LMP2; 종양-선택적 발현을 갖는 비돌연변이된 발암태아 단백질, 예를 들어, 암배아 항원 및 알파-페토단백질을 포함할 수 있다.
- [0194] 다른 구현예에서, 항원은 병원성 미생물로부터 또는 기회주의적 병원성 미생물 (또한 본원에서 감염성 질환 미생물로서 호칭되는), 예를 들어, 바이러스, 진균류, 기생충 및 세균으로부터 획득되거나 유래된다. 특정 구현예

에서, 상기 미생물로부터 유래된 항원은 전장 단백질을 포함한다.

[0195] III. 면역 이펙터 세포

[0196] A. 조혈 전구체 세포

[0197] CAR과 같은 항원성 수용체를 발현하도록 가공된 본원 개시내용의 PSC는 당업계에 공지된 방법에 의해 HPC로 분화될 수 있다. 하나의 방법에서, CAR-PSC는 지시된 분화를 통해 $CD34^+$ HPC로 분화된다. 또 다른 방법에서, CAR-PSC는 정방향 프로그래밍을 통해 $CD34^+$ HPC로 분화된다.

[0198] 1. 지시된 분화

[0199] 본원의 개시내용의 특정 구현에는 CAR-PSC의 HPC로의 분화에 관한 것이다. CAR-PSC는 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 제8,372,642호에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 방법에 의해 HPC로 분화될 수 있다. 하나의 방법에서, BMP4, VEGF, Flt3 리간드, IL-3, 및 GM-CSF의 조합을 사용하여 조혈 분화를 촉진시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 배양물의 분화를 위해 PSC를 제조하기 위한 제1 배지, BMP4, VEGF, 및 FGF를 포함하는 제2 배지에 이어서 Flt3 리간드, SCF, TPO, IL-3, 및 IL-6을 포함하는 제3 배지에서의 배양물로 순차적 발현은 만능 세포를 HPC 및 조혈 세포로 분화시킬 수 있다. 제2 한정된 배지는 또한 헤파린을 포함할 수 있다. 추가로, BMP4 및 VEGF를 함유하는 배지에서 FGF-2 (50 ng/ml)의 내포는 만능 세포로부터 조혈 전구 세포의 생성 효율을 증진시킬 수 있다. 추가로, 제1 한정된 배지에서 글리코젠 신타제 키나제 3 (GSK3) 억제제 (예를 들어, CHIR99021, BIO, 및 SB-216763)의 내포는 추가로 HPC의 생성을 추가로 증진시킬 수 있다.

[0200] 일반적으로, 만능 세포의 조혈 전구체 세포로의 분화는 한정되거나 비한정된 조건을 사용하여 수행될 수 있다. 한정된 조건은 일반적으로 수득한 세포가 사람 대상체에게 투여되는 것으로 의도되는 구현예에서 바람직할 수 있는 것으로 인지된다. 조혈 줄기 세포는 한정된 조건 (예를 들어, TeSR 배지를 사용하여) 하에서 만능 줄기 세포로부터 유래될 수 있고, 조혈 세포는 만능 세포로부터 유래된 배아체로부터 생성될 수 있다. 다른 구현예에서, 만능 세포는 OP9 세포 또는 마우스 배아 섬유아세포 상에서 동시 배양되고 후속적으로 분화될 수 있다.

[0201] 만능 세포는 분화 공정의 일부로서 배아체 또는 응집물을 형성하도록 될 수 있다. 분화를 유도하기 위해, “배아체” (EB) 또는 성장하는 세포의 클러스터의 형성은 일반적으로 사람 만능 줄기 세포의 EB로의 시험관내 응집을 포함하고 내배엽, 외배엽 및 중배엽 기원을 나타내는 다중 조직 유형으로의 자발적 및 무작위 분화를 가능하게 한다. 따라서 3차원 EB를 사용하여 조혈 세포 및 내피 세포의 일부 분획물을 생성할 수 있다.

[0202] EB는 하기의 프로토콜을 사용하여 형성될 수 있다. MATRIGELTM 코팅된 플레이트 상에서 피더 부재 성장에 적응된 미분화된 iPSC는 실온에서 약 8 내지 10분동안 0.5M EDTA 처리를 사용하여 컨플루언스에서 수확될 수 있다. EDTA는 항온처리 후 흡인 제거하고 EB는 rock 억제제 또는 블레비스타틴을 함유하는 SFD 배지에서 세포를 수거함에 의해 형성될 수 있다. 배지는 다음 날 상이한 사이토킨 제형을 함유하는 EB1 분화 배지로 변화될 수 있다. 세포는 ml 당 25만 내지 50만 세포의 밀도로 분주하여 응집물 형성을 촉진시킨다.

[0203] 응집물 형성을 촉진시키기 위해, 세포는 75% IMDM (Gibco), RA 보충물 없이 0.05% N2 및 B-27이 보충된 25% 랩스 개질된 F12 (Cellgro), 200 mM 1-글루타민, 0.05 mg/ml 아스코르브산-2-포스페이트 마그네슘 염(Asc 2-P) (WAKO), 및 4.5×10^{-4} MTG로 이루어진, 무혈청 분화 (SFD) 배지에서 밤새 항온처리를 위해 저-접착 플레이트에 전달될 수 있다. 다음 날, 세포는 각각의 웰로부터 수거하고 원심분리할 수 있다. 세포는 이어서 제1의 4일 분화 동안 약 50 ng/ml 골 형태형성 인자 (BMP4), 약 50 ng/ml 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 및 50 ng/ml zb FGF가 보충된 SFD 기본 배지로 이루어진, “EB 분화 배지”에 재현탁시킬 수 있다. 세포는 48시간 동안 절반 공급한다. 분화 5일째에, 배지는 50 ng/ml 줄기 세포 인자 (SCF), 약 50 ng/ml Flt-3 리간드 (Flt-3L), 50 ng/ml 인터류킨-6 (IL-6), 50 ng/ml 인터류킨-3 (IL-3), 50 ng/ml 트롬보포이에틴 (TPO)이 보충된 SFD 배지로 구성된 제2 배지로 대체한다. 세포에 신선한 분화 배지가 49시간 마다 절반 공급된다. 배지 변화는 5분 동안 300g에서 분화 배양물을 회전 침강시키고 분화 배양물로부터 용적 절반을 흡인 제거하고 이를 새로운 배지로 새롭게 함에 의해 수행된다. 특정 구현예에서, EB 분화 배지는 약 BMP4 (예를 들어, 약 50 ng/ml), VEGF (예를 들어, 약 50 ng/ml), 및 임의로 FGF-2 (예를 들어, 약 25-75 ng/ml 또는 약 50 ng/ml)을 포함할 수 있다. 상등액은 흡인 제거될 수 있고 분화 배지로 대체될 수 있다. 대안적으로 세포에 2일 마다 신선한 배지가 절반 공급될 수 있다. 세포는 분화 공정 동안에 상이한 시점에서 수확될 수 있다.

- [0204] HPC는 한정된 배지를 사용하여 만능 줄기 세포로부터 배양될 수 있다. 한정된 배지를 사용하여 만능 세포를 조혈 CD34⁺ 줄기 세포로 분화시키기 위한 방법은 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 출원 제 12/715,136호에 기재되어 있다. 이들 방법은 본원의 개시내용에 따라 사용될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0205] 예를 들어, 한정된 배지를 사용하여 조혈 CD34⁺ 분화를 유도할 수 있다. 한정된 배지는 성장 인자 BMP4, VEGF, Flt3 리간드, IL-3 및/또는 GM-CSF를 함유할 수 있다. 만능 세포는 BMP4, VEGF, 및 임의로 FGF-2를 포함하는 제1의 한정된 배지에서 배양하고 이어서 (Flt3 리간드, IL-3, 및 GM-CSF) 또는 (Flt3 리간드, IL-3, IL-6, 및 TPO)를 포함하는 제2 배지에서 배양할 수 있다. 제1 및 제2의 배지는 또한 하나 이상의 SCF, IL-6, G-CSF, EPO, FGF-2, 및/또는 TPO를 포함할 수 있다. 실질적으로 저산소 조건(예를 들어, 20% O₂ 미만)은 추가로 조혈 또는 내피 분화를 촉진시킬 수 있다.
- [0206] 세포는 실질적으로 기계적 또는 효소적 수단 (예를 들어, 트립신 또는 TrypLETM를 사용하여)을 통해 개별화될 수 있다. ROCK 억제제(예를 들어, H1152 또는 Y-27632)는 또한 상기 배지에 포함될 수 있다. 이들 근접법은 예를 들어, 로봇 자동화를 사용하여 자동화될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0207] 특정 구현예에서, 실질적으로 저산소 조건을 사용하여 만능 세포의 조혈 선조체 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 약 20.8% 미만의 대기 산소 함량은 저산소인 것으로 고려된다. 배양물 중 사람 세포는 주위 공기와 비교하여 감소된 산소 함량을 갖는 대기 조건에서 성장시킬 수 있다. 상기 상대적인 저산소증은 배양 배지에 노출된 대기 산소를 감소시킴에 의해 성취될 수 있다. 배아 세포는 주위 수준의 이산화탄소와 함께, 일반적으로 약 1% 내지 약 6%의 감소된 산소 조건하에서 생체내 발육시킨다. 이론에 국한시키지 않는 것 없이, 저산소 조건은 특정 배아 발육 조건의 양상을 모방할 수 있는 것으로 예상된다. 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 저산소 조건은 특정 구현예에서 사용하여 iPSC 또는 hESC와 같은 만능 세포의 HPC와 같은 보다 분화된 세포 유형으로의 추가 분화를 촉진시킬 수 있다.
- [0208] 하기의 저산소 조건을 사용하여 만능 세포의 조혈 선조체 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 약 20% 미만, 약 19% 미만, 약 18% 미만, 약 17% 미만, 약 16% 미만, 약 15% 미만, 약 14% 미만, 약 13% 미만, 약 12% 미만, 약 11% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 대기 산소 함량을 사용하여 조혈 전구체 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 저산소 대기는 약 5% 산소 가스를 포함한다.
- [0209] 임의의 소정의 조혈 선조체 세포 확장에서 사용되는 특정 배지에 상관 없이, 사용되는 배지는 바람직하게 약 0.1 ng/mL 내지 약 500 ng/mL, 보다 일반적으로 10 ng/mL 내지 100 ng/mL의 농도로 적어도 하나의 사이토킨이 보충된다. 적합한 사이토킨은 c-키트 리간드(KL) (또한 강철 인자 (St1), 비만 세포 성장 인자 (MGF), 및 줄기 세포 인자 (SCF)), IL-6, G-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-1 α , IL-11 MIP-1 α , LIF, c-mpl 리간드/TPO, 및 flk2/flk3 리간드(Flt2L 또는 Flt3L)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특히, 배양물은 SCF, Flt3L 및 TPO 중 적어도 하나를 포함한다. 보다 특히, 배양물은 SCF, Flt3L 및 TPO를 포함한다.
- [0210] 하나의 구현예에서, 사이토킨은 배지에 함유되고 배지 관류에 의해 보충된다. 대안적으로, 생물반응기 시스템을 사용하는 경우, 사이토킨은 별도의 주입구 포트를 통해 농축된 용액으로서 배지 관류 없이 별도로 첨가될 수 있다. 사이토킨이 관류 없이 첨가되는 경우, 이들은 전형적으로 새로운 사이토킨이 대략 2 내지 4일마다 첨가되면서 생물반응기 내 용적의 10분의 1 내지 1/100과 동일한 양으로 10x 내지 100x 용액으로서 첨가된다. 추가로, 새로운 농축된 사이토킨은 또한 관류된 배지에서 사이토킨에 추가로 별도로 첨가될 수 있다.
- [0211] 일부 구현예에서, HPC는 파괴된 메틸-CpG 결합 단백질 2 (MeCP2)를 나타내고 골수 분화 또는 림프구 분화를 촉진시키기 위한 조건하에서 배양한다. 일부 양상에서, HPC는 필수적으로 메틸화된 DNA에 결합하지 않는 비-기능성 MeCP2를 발현한다. 특정 양상에서, HPC는 MeCP2 DNA 결합 활성을 수행하기에 충분한 수준에서 MeCP2를 발현하지 않는다. 특정 양상에서, MeCP2는 MeCP2 유전자 내 절단 또는 돌연변이에 의해 비-기능성이다. 일부 양상에서, 파괴된 MeCP2를 나타내는 HPC를 수득하는 것은 HPC를 siRNA, shRNA 또는 MeCP2의 소분자 억제제와 접촉시킴을 포함한다.
- [0212] (i) 예시적인 3D 분화 방법
- [0213] PSC를 HPC로 분화시키기 위한 예시적 방법은 예를 들어 필수 8 (E8) 배지에서 MATRIGELTM- 또는 비트로넥틴 코팅된 플레이트 상에서 피더 부재 조건하에서 유지시킴을 포함한다. 응집물은 PSC로부터 제조하고, 특히, 50 ng/ml FGF2, 50 ng/ml VEGF, 2 μ M CHIR99021 (GSK-3 억제제), 및 블레비스타탄 (미오신-II 억제제) (예를 들

어, 2-10 μ M, 예를 들어 10 μ M))이 보충된 필수 3 (E3) 배지(E8 배지의 8개 성분 중 단지 3개를 함유하는: DMEM/F12 기본 배지, 아스코르브산(예를 들어, 100-500 μ M), 2-포스페이트 마그네슘 및 나트륨 셀레나이트)에서 mL 당 50만 내지 100만 세포의 밀도로 서브-컨플루언트 (예를 들어, <80% 컨플루언스)한다. 응집물 형성 및 후속적 단계는 연속 진탕 하에 초-저 접착 (ULA) 플라스크에서 24시간 배양 동안 수행한다.

[0214] 형성된 세포 응집물(즉, EB)는 추가로 조혈 중배엽 유도 사이토킨 - 25 ng/ml BMP4, 50 mg/ml VEGF 및 50 ng/ml FGF2이 보충된 무혈청 분화 배지(예를 들어, 50% IMDM, 50% Hams F12 배지, 100 μ g/ml 폴리비닐 알콜, 100 μ g/ml 재조합 사람 혈청 알부민, 1x 비-필수 아미노산 보충물 (Invitrogen), 0.1x 화학적으로 한정된 지질 보충물 (Invitrogen), 125 μ M 아스코르브산 2-포스페이트 마그네슘, 0.25 μ M 리놀레산, 미량 원소 보충물 A (0.3x), B (0.2x) 및 C (0.1x) (Corning), 5 mM 염화나트륨, 100 μ M 모노티오글리세롤, 20 μ M 에탄올아민, 100 ng/ml 헤파린, 및 10 ng/ml IGF1)에 전달한다. 배양은 2일 째에 완전한 배지 변화와 함께 예를 들어, 4일 동안 계속한다.

[0215] 조혈 CD34⁺ 선조체의 분화 및 확장을 지지하기 위해, 세포 응집물은 추가로 조혈 지지 사이토킨, 예를 들어 50 ng/ml SCF, 20 mg/ml TPO, 10 ng/ml FLT3L, 20 ng/ml IL-3, 및 25 ng/ml BMP4가 보충된 무혈청 분화 배지 (상기한 바와 같이)에 전달한다. 배양은 2일 째에 완전한 배지 변화와 함께 예를 들어, 4일 동안 계속한다.

[0216] 배양물은 9일과 같이 분화 공정 후 수확한다. 단일 세포 현탁액은 아쿠타제에서와 같이 분화된 세포 응집물의 분해를 통해 수득한다. 예를 들어, MACS에 의해 분리된 것과 같이 분리된 CD34⁺ 세포는 이어서 T/NK 분화 배양물에 분주하거나 분리 후 1시간 이내에 이후 사용을 위해 냉동 보존한다.

[0217] (ii) 예시적 2D 분화 방법

[0218] 대안적인 예시적 방법에서, PSC는 HPC의 생성을 위해 2D 분화 프로토콜에 적용한다. 먼저, PSC는 필수 8 (E8) 배지에서 예를 들어, MATRIGEL™- 또는 비트로넥틴-코팅된 피더 부재 조건하에서, 예를 들어, 5 내지 10 세대 동안 저산소 조건에 익숙해지게 한다. PSC는 개별화하고 5 μ M 블레비스타틴(예를 들어, 2-10 μ M, 예를 들어, 10 μ M)가 보충된 무혈청 한정된 (SFD) 배지의 존재하에 25000/cm²의 밀도로 PureCoat 아민 코팅된 6-웰 플레이트 (Corning Inc) 상에 분주한다. SFD 기본 배지는 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (글루타민 및 25 mM HEPES+P/S를 갖는), 25% Hams F12 (Mediatech 10-080-CV), 0.5% N2-보충물(Invitrogen 17502-048), 레티노산 없이 1% B27 보충물(Invitrogen 12587-010), 0.05% BSA, 50 μ g/ml 아스코르브산, 및 50 ng/ml의 BMP-4, VEGF, 및 bFGF가 보충된 4.5 $\times 10^{-4}$ M 모노티오글리세롤을 함유할 수 있다.

[0219] 조혈 분화의 유도는 예를 들어, 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (글루타민 및 25 mM HEPES+P/S를 갖는), 25% Hams F12 (Mediatech 10-080-CV), 0.5% N2-보충물(Invitrogen 17502-048), 레티노산 없이 1% B27 보충물 (Invitrogen 12587-010), 0.05% BSA, 50 μ g/ml 아스코르브산, 및 50 ng/ml의 BMP4, VEGF, 및 bFGF가 보충된 4.5 $\times 10^{-4}$ M 모노티오글리세롤을 함유하는 SFD 기본 배지에서 배양함에 의해 1일째 개시한다. 2일째에 배지를 흡인 제거하고 세포는 추가로 48시간 동안 신선한 EB1 배지 (예를 들어, 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (글루타민 및 25 mM HEPES+P/S를 갖는), 25% Hams F12 (Mediatech 10-080-CV), 0.5% N2-보충물(Invitrogen 17502-048), 레티노산 없이 1% B27 보충물(Invitrogen 12587-010), 0.05% BSA, 50 μ g/ml 아스코르브산, 및 50 ng/ml의 BMP4, VEGF, 및 bFGF가 보충된 4.5 $\times 10^{-4}$ M 모노티오글리세롤)에 위치시킨다.

[0220] 5 내지 10일째에, 배지를 흡인 제거하고 세포는 다음 48시간 동안 BE2 배지에 위치시킨다. 상기 EB2 배지는 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (글루타민 및 25 mM HEPES+P/S를 갖는), 25% Hams F12 (Mediatech 10-080-CV), 0.5% N2-보충물(Invitrogen 17502-048), 레티노산 없이 1% B27 보충물(Invitrogen 12587-010), 0.05% BSA, 50 μ g/ml 아스코르브산, 및 50 ng/ml의 Flt-3 리간드, IL3, IL6, SCF, 및 각각 5ng/ml 및 5000U/ml의 헤파린에서 TPO가 보충된 4.5 $\times 10^{-4}$ M 모노티오글리세롤을 함유하는 SFD 기본 배지를 포함할 수 있다. 세포는 TrypLE를 사용한 분화 7, 8, 9, 10일째 수확하고 HPC 마커 및 림프구 선조체의 존재에 대해 염색하였다.

[0221] 2. 정방향 프로그래밍

[0222] 본원의 개시내용의 특정 구현에는 조혈 세포 분화/기능을 위해 중요한 프로그래밍 유전자의 조합의 발현을 통한 CAR-PSC의 정방향 프로그래밍에 의해 HPC를 제공한다. 하나의 방법에서, PSC는 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용되는 PCT/US2016/057893에 기재된 바와 같이 ETS 유전자 (예를 들어, ETC2 또는 ERG), 조혈 발육 유전자 (예를 들어, GATA2) 및 호모에박스 유전자 (예를 들어, HOXA9)와 같은 적어도 3개의 조혈 전구체 프로그래밍 유전자를 발현하기 위해 변형시킨다. 특정 양상에서, ETV2/ERG, GATA2, 및 HOXA9 유전자는 CAR-PSC로 형질

감염된 양방향 강한 프로모터를 사용하여, 유도성 *PiggyBac* 벡터와 같은 하나의 벡터에 의해 동시 발현시킨다.

[0223] 추가로, EGH-CAR-PSC는 추가로 장기간 접목 잠재력을 위한 추가의 유전자를 발현하도록 추가로 변형시킬 수 있다. 예시적인 유전자는 HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1, HOXA4, ZNF414, KLF4, ZNF131, BCL2, ETV6, ZNF350, 및/또는 RBAK를 포함한다. 예를 들어, PSC는 HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1, 및 HOXA4를 발현하도록 하나 이상의 벡터로 형질감염시킬 수 있다.

[0224] 바람직하게, ETV2/GAT2/HOXA9 유전자들은 PSC의 조혈 전구체 세포로의 프로그램을 진행하기에 충분한 기간동안에만 발현한다. 따라서, 조혈 전구체 프로그래밍 유전자들은 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 따라서, 조혈 전구체 프로그래밍 유전자의 발현은 다중-계통 조혈 세포로의 프로그램을 진행하기에 충분한 기간 동안 PSC에서 유도될 수 있다. 상기 기간은 약 1일 내지 약 20일, 예를 들어, 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일일 수 있다. 대안적으로, 조혈 전구체 프로그래밍 유전자들은 에피솜성 벡터에 의해 PSC로 도입될 수 있다. 따라서, 조혈 전구체 프로그래밍 유전자들은 PSC에서 일시적으로 발현될 수 있다.

[0225] B. 림프구 세포 분화

[0226] HPC는 이어서 T 세포, NK 세포 및 T/NK 세포를 포함하는, 림프구 계통 세포로 추가로 분화될 수 있다. 일부 양상에서, 분화 동안에 HPC는 림프구 세포로의 분화를 위해 8 내지 11일과 같이 7 내지 12일째에 단리된다. 상기 단계에서 HPC는 CD34 및 CD43의 발현에 의해 동정될 수 있다. 추가로, 림프구 잠재력을 갖는 HPC는 11일째에 감소하는, 저수준으로 CD144, DLL4, CD7 및 CD235를 발현할 수 있고, 이는 이들 마커의 발현의 특정 역치 수준이 DLL4의 존재하에 세포를 림프구 분화로 프라임하기 위해 요구됨을 의미한다.

[0227] 일부 양상에서, 분화 공정의 7일, 8일, 9일, 10일 또는 11일과 같이 7 내지 11일째에 단리된 HPC는 T 및 NK세포와 같은 림프구 세포로 분화될 수 있다. 일부 양상에서, 림프구 선조체에 대한 오리진의 타이밍은 혈관내피세포 선조체의 감소와 HPC 분화 동안에 적혈구 선조체의 출현과 일치한다. 특정 양상에서, 9일째 HPC는 T 세포를 생성하는데 있어서 증가된 효율을 가질 수 있다. 림프구 분화를 할 수 있는 HPC는 특정 마커의 발현에 의해 단리되고/되거나 동정될 수 있다. 예를 들어, CD34 및/또는 CD43의 표면 발현을 갖고, 특히 CD34 및 CD43 둘다를 발현하는 세포는 MACS 분류에 의한 것과 같이 림프구 분화를 위해 선택될 수 있다.

[0228] 림프구 선조체를 검출하기 위한 추가의 마커는 DLL4, CD144, CD31, CD34, CD43^{lo}, CD45^{lo/-}, CD235, CD7, Flk-1, APNLR를 포함한다. 특정 양상에서, CD34/CD7, CD235/CD7, DLL4/CD34, DLL4/CD31, DLL4/CD144, 또는 CD34/CD43^{lo} 이중 양성 집단의 존재는 림프구 선조체를 동정하기 위해 사용된다. HPC 상의 CD144 발현은 CD31, CD34 및 DLL4로 동시 염색한다. HPC 상의 CD7 발현은 CD235, CD34 및 CD43로 동시 염색한다. 따라서, CD144 및 CD7을 동시 발현하는 HPC는 림프구 잠재력이 혈관내피세포 마커와 함께 막 결합된 노치 리간드 (DLL4)를 발현하는 전구체를 포획하고 시험관내 확립된 혈액생성의 계통을 생성할 수 있는 림프구 선조체를 출현시키기 위한 표현형 시그네처를 생성함을 입증한다. 특정 양상에서, HPC는 CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD6, CD335, Flk-1, 및 DLL4를 포함하는 표면 마커의 분류에 의해 증진된 림프구 잠재력을 갖는 세포로 추가로 분류될 수 있다. 일부 양상에서, HPC의 CD114/CD34, CD144/CD45, CD144/CD7, 및 CD144/CD34/CD45/CD7의 양성 분획물은 림프구 세포로 분화된다. 특정 양상에서, HPC의 CD144/CD7 양성 분획물은 림프구-세포로 분화된다.

[0229] HPC는 림프구 분화를 위한 한정된 피더 부재 조건에서 배양될 수 있다. 배양 배지는 레트로벡틴, 피브로벡틴 또는 RGD 펩타이드와 같은 하나 이상의 매트릭스 성분들을 함유할 수 있다. 임의의 이론에 국한되는 것 없이, 매트릭스 성분은 배아 줄기 세포의 성장을 위한 고형 지지체를 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 매트릭스 성분은 표면의 배양에 적용될 수 있고 세포를 배지에 씨앗하기 전 배양 배지와 접촉시킬 수 있다. 예를 들어, 세포는 세포를 클립프로 기계적으로 분리하거나 세포를 개별화하고 조혈 전구체 세포로의 분화를 유도하기 전, 피브로벡틴 또는 MATRIGELTM으로 코팅된 플레이트 상에 한정된 배지 (예를 들어, TeSR 배지)에서 배양할 수 있다.

[0230] 다양한 매트릭스 성분을 사용하여 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 IV), 라미닌, 비트로넥틴, MATRIGELTM, 젤라틴, 폴리라이신, 트롬보스폰딘(예를 들어, TSP-1, -2, -3, -4 및/또는 -5), 및/또는 PRONECTIN-FTM을 포함하는 만능 세포를 배양할 수 있다. 특정 구현예에서, TeSR을 사용하여 이전에 배양된 세포와 함께 단지 MATRIGELTM, 콜라겐 IV, 또는 라미닌의 사용은 세포 생존능에 대한 가능한 부작용으로 인해 회피될 수 있지만; 그럼에도 불구하고 이들 조성물은 다른 매트릭스 성분과 조합하여 유리하게 사용될 수 있다. 이들 매트릭스 성분들의 조합은 세포 성장 및 세포 생존능을 촉진시키기 위해 추가의 이득을 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6개

이상의 상기 매트릭스 성분들을 사용하여 예를 들어, 조혈 분화 전에 세포를 배양할 수 있다.

- [0231] 일부 구현예에서, 아스코르브산은 림프구 분화를 증진시키기 위해 사용될 수 있다. 한정된 배지에 아스코르브산 약 10 μ M 내지 약 1 mM, 예를 들어, 100 내지 500 μ M, 예를 들어, 약 50 μ M 내지 약 100 μ M, 예를 들어, 약 95 μ M을 보충할 수 있다. 아스코르브산은 다양한 아스코르베이트, 예를 들어, 아스코르브산 인산마그네슘으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 니코틴아미드 (예를 들어, 니코틴산)를 사용하여 예를 들어, 약 0.1 mM 내지 약 5 mM의 농도에서 림프구 분화를 증진시킬 수 있다.
- [0232] 일부 양상에서, HPC는 대상체에서 노치 리간드의 생성을 증가시키는 물질을 투여함에 의해 노치 리간드의 내인성 활성을 변화시킴에 의해 T 세포와 같은 림프구 세포로 분화된다. 상기 방법은 또한 배지 내 세포를 배양함을 포함하고, 여기서, 상기 배지는 유효량의 노치 리간드 및 IL-7, IL-15, SCF, Flt-3 및 IL-3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 사이토킨을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 배지는 추가로 IL-6을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 노치 리간드는 델타4 노치 리간드(DLL4), 예를 들어, DLL4:Fc 키메라이다.
- [0233] T 세포 계통의 세포의 분화 및 증식을 촉진시키고 유지하는 노치 리간드가 선택된다. 노치 리간드는 사람 기원일 수 있거나 설치류, 개, 고양이, 돼지, 양, 소, 염소 및 영장류와 같은 포유동물 종을 포함하는 다른 종으로부터 유래될 수 있다. 노치 리간드의 특정 예는 델타 패밀리를 포함한다. 델타 패밀리는 델타-1 (Genbank 승인번호 AF003522, 호모 사피엔스), 델타-3 (Genbank 승인번호 AF084576, 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*)), 델타 유사 1 (Genbank 승인번호 NM-005618 및 NP-005609, 호모사피엔스; Genbank 승인번호 X80903, I48324, 엠 무스쿨루스(*M. musculus*)), 델타 유사 3 (Genbank 승인번호 NM-053666, N-446118, 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*)), 델타-4 (Genbank 승인번호 AF273454, BAB18580, 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*); Genbank 승인번호 AF279305, AAF81912, 호모 사피엔스), 및 델타 유사 4 (Genbank 승인번호 Q9NR61, AAF76427, AF253468, NM-019074, 호모 사피엔스; Genbank 승인번호 NM-019454, 무스 무스쿨루스(*mus musculus*))를 포함한다. 노치 리간드는 상업적으로 가용하거나 재조합 DNA기술에 의해 생성될 수 있고 다양한 정도로 정제될 수 있다.
- [0234] 상기 방법은 추가로 분화된 NK 세포를 생성하기에 충분한 시간의 지속 기간동안 상기된 배양물 중에 HPC 세포를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 분화된 NK 세포는 T 세포와 함께 배양물 중에서 나타나지만 NK 세포는 6주 후 증식을 중단할 수 있다. 일반적으로, NK 세포 수의 증가 및/또는 분화의 이들 상태의 결정은 당업자에게 공지된 통상의 방법을 사용하여 평가한다. 예를 들어, 배양된 세포는 세포를 항-CD56 및 항-CD3 항체로 염색함에 의해 NK 세포의 발육에 대해 유동 세포측정기로 모니터링할 수 있다. 항-CD3 항체, 예를 들어, OKT3은 0.5 내지 2 μ g의 농도로 존재할 수 있다. CD56⁺/CD3⁻인 세포는 분화된 NK 세포를 지칭한다.
- [0235] 특정 양상에서, CD3⁺ T 세포 또는 CD56⁺CD3⁻ NK 세포로의 림프구 분화는 레트로벡터 및 DLL-4 코팅된 플레이트 상에 2D 저산소 배양에 의해 수행된다. 특정 양상에서, 비조직 배양물-처리된 플레이트는 HPC의 림프구 분화에 사용하기 위해 DLL4:Fc 키메라 단백질 및 레트로벡터(피브로벡터 단백질 CH-296; Takara Shuzo, Japan)으로 코팅할 수 있다. 상기 분화는 제1 기간의 T/NK 세포 분화에 이어서 제2 기간의 T 또는 NK 세포 확장을 포함할 수 있다. 제1 기간의 분화는 약 1주 내지 약 2주 동안일 수 있고, 제2 기간의 확장은 또한 약 1주 내지 약 2주 동안일 수 있다. 따라서, 림프구 분화 및 확장의 완전한 기간은 약 2 내지 4주 동안일 수 있다.
- [0236] 일부 구현예에서, 림프구 분화 공정은 항원-특이적 표적 세포, 예를 들어, 항원-특이적 종양 세포와 동시 배양하여 T 세포 및 NK 세포의 세포독성 활성을 증가시킴을 포함할 수 있다. 특정 양상에서, 림프구 분화의 확장 기간은 항원-특이적 표적 세포와의 동시 배양을 포함할 수 있다. 예를 들어, CD19-CAR-T 세포 또는 NK 세포는 예를 들어, 1 내지 3주 동안, 특히 2주 동안의 확장 기간 동안에 CD19⁺ 종양 세포 (예를 들어, CD19⁺ 다우디(Daudi) 세포)와 동시 배양할 수 있다. 일부 양상에서, 확장 기간은 확장을 개선시키기 위해 IL2, IL15, 및/또는 IL21, 특히 IL2와 같은 사이토킨의 첨가를 추가로 포함할 수 있다. 사이토킨의 농도는 최적화될 수 있고, 예를 들어, 10 내지 50 μ M이다.
- [0237] **C. 세포 배양**
- [0238] 특정 구현예에서, 실질적으로 저산소 조건을 사용하여 HPC의 골수 또는 림프구 계통으로의 분화를 촉진시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 약 20% 미만, 약 19% 미만, 약 18% 미만, 약 17% 미만, 약 16% 미만, 약 15% 미만, 약 14% 미만, 약 13% 미만, 약 12% 미만, 약 11% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 대기 산소 함량을 사용하여 조혈 전구체 세포로

의 분화를 촉진시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 저산소 대기는 약 5% 산소 가스를 포함한다.

[0239] 본원에 기재된 바와 같이, 하나 이상의 한정된 배양 배지는 HPC의 골수 및 림프구 계통으로의 분화를 촉진시키기 위해 유리하게 사용될 수 있고; 특히, 혈청 및 마우스 피더 층과 같은 동물 생성물의 제거는 세포의 동물 생성물로의 노출과 연관된 위험을 감소시킬 수 있고 보다 안전하게 사람 대상체에게 투여될 수 있는 세포의 생성을 가능하게 한다. 통상의 줄기 세포 배양 발육은 줄기 세포의 다양한 세포 유형으로의 분화를 위해 혈청 생성물 및 마우스 피더 층에 의존하기 때문에, 이들 통상의 과정들은 분화가 수행될 수 있는 스케일을 제한하였고, 생물학적 생존능 및 잠재적 오염을 증가시키고 이들이 유용한 것으로 입증될 수 있는 통상의 치료요법에서 ES 세포의 사용을 심하게 방해하였다.

[0240] 일반적으로, 본원의 개시내용의 세포는 세포 성장을 지속시킬 수 있는 영양물 풍부 완충 용액인, 배양 배지에서 배양한다. 만능 줄기 세포를 본원에 기재된 방법에 따라 단리하고, 확장시키고, 조혈 전구체 세포 및 조혈 세포로 분화시키기 위해 적합한 배양 배지는 고용량의 돌베코 변형된 이글 배지 (DMEM), DMEM/F-15, RPMI 1640, 이스코브 변형된 돌베코 배지(IMDM), 및 Opti-MEM SFM (Invitrogen Inc.)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 화학적으로 한정된 배지는 사람 혈청 알부민, 사람 ExCyte 지질단백질, 트랜스페린, 인슐린, 비타민, 필수 및 비-필수 아미노산, 나트륨 피루베이트, 글루타민이 보충된 이스코브(Iscove's) 변형된 돌베코 배지 (IMDM) (Gibco)와 같은 최소 필수 배지를 포함하고 미토겐이 또한 적합하다. 본원에 사용된 바와 같이, 미토겐은 세포 분열을 자극하는 제제를 언급한다. 제제는 일반적으로 세포가 세포 분열을 개시하도록 고무시켜 유사분열을 유발하는 단백질의 일부 형태인 화학물질일 수 있다. 하나의 구현예에서, 미국 출원 번호 제08/464,599호 및 WO 96/39487에 기재된 것들과 같은 무혈청 배지, 및 미국 특허 제5,486,359 호에 기재된 바와 같은 “완전한 배지”는 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위해 고려된다. 일부 구현예에서, 배양 배지에는 10% 태아 소 혈청 (FBS), 사람 자가 혈청, 사람 AB 혈청 또는 헤파린 (2U/ml)이 보충된 혈소판 풍부 혈장이 보충된다.

[0241] 면역 세포는 세포의 골수 또는 림프구 계통으로의 분화를 촉진시키기에 충분히 인자의 세포내 수준을 증가시키는 조건하에서 배지 내 만능 줄기 세포 또는 조혈 전구체 세포를 배양함에 의해 생성될 수 있다. 상기 배지는 또한 다양한 종류의 성장 인자 처럼 하나 이상의 조혈 세포 분화 및 성숙화 제제를 함유할 수 있다. 이들 제제는 세포가 보다 성숙한 표현형이 되거나 우선적으로 성숙한 세포의 생존을 촉진시키거나 이들 효과 둘다의 조합을 갖도록 유도하는데 일조할 수 있다. 분화 및 성숙화 제제는 조혈 세포 계통의 세포의 성장을 촉진시킬 수 있는 가용한 성장 인자 (펩타이드 호르몬, 사이토킨, 리간드-수용체 복합체 및 다른 화합물)를 포함할 수 있다. 상기 제제의 비제한적인 예는 조혈 또는 내피 성장 인자, 예를 들어, 섬유아세포 성장 인자(FGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이에틴(TPO), FLT-3 리간드 (FLT3L), 인터류킨-3 (IL-3), 인터류킨-6 (IL-6), 인터류킨-9 (IL-9), 또는 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 또는 이의 이소형 또는 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0242] IV. 항원-특이적 면역 세포의 용도

[0243] 특정 양상의 방법 및 조성물에 의해 제공된 항원-특이적 면역 이펙터 세포는 다양한 응용에 사용될 수 있다. 이들은 이에 한정되지 않지만, 몇 가지 거론하자면, 세포의 생체내 이식 또는 주입; 세포 독성 화합물, 발암물질, 돌연변이원 성장/조절 인자, 약제학적 화합물 등의 시험관내 스크리닝; 혈액학적 질환 또는 손상의 기전에 대한 해명; 약물 및/또는 성장 인자가 작용하는 기전에 대한 연구; 환자 내 암의 진단 및 모니터링; 유전자 치료요법; 및 생물학적 활성 생성물의 제조를 포함한다.

[0244] A. 시험 화합물 스크리닝

[0245] 본원 개시내용의 면역 세포를 사용하여 본원에 제공된 림프구세포의 특성에 영향을 주는 인자 (예를 들어, 용매, 소분자 약물, 펩타이드, 폴리뉴클레오타이드) 또는 환경 조건 (예를 들어, 배양 조건 또는 조작)에 대하여 스크리닝할 수 있다.

[0246] 본원 개시내용의 특정 스크리닝 적용은 약물 연구에서 약제학적 화합물의 시험에 관한 것이다. 독자는 일반적으로 문헌(표준 텍스트북 *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997, 및 미국 특허 제5,030,015호)을 참고한다. 특정 양상에서, 골수 및 림프구 세포는 짧은 기간 배양에서 조혈 세포 및 전구체에 대해 이전에 수행되었던 바와 같이 표준 약물 스크리닝 및 독성 검정을 위한 시험 세포의 역할을 수행한다. 후보 약제학적 화합물에 대한 활성 평가는, 일반적으로 특정 양상으로 제공된 조혈세포 또는 전구체를 후보 화합물과 조합하는 단계, 상기 화합물에 기인할 수 있는 세포의 형태, 마커 표현형 또는 대사 활성의 임의의 모든 변화를 (처리되지 않은 세포 또는 비활성 화합물로 처리된 세포와 비교하여) 측정하는 단계, 및 이후 상기 화합

물의 효과와 관찰된 변화를 상호 관련시키는 단계를 포함한다. 상기 스크리닝은, 해당 화합물이 조혈 세포 또는 전구체에 대하여 약리학적 효과를 가지도록 디자인되었기 때문에, 또는 어딘가 효과를 갖도록 디자인된 화합물이 조혈 세포 또는 전구체에 대해 의도치 않은 부작용을 가질 수 있기 때문에 수행할 수 있다. 2개 이상의 약물은 가능한 약물-약물간 상호작용 효과를 검출하기 위해, 조합 (세포와 동시에 또는 순차적으로 조합)하여 시험될 수 있다.

[0247] **B. 입양 세포 치료요법**

[0248] 일부 구현예에서, 본원의 개시내용은 본원의 개시내용의 유효량의 면역세포를 투여함을 포함하는 면역치료요법을 위한 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 의학적 질환 또는 장애는 면역 반응을 유발하는 면역 세포 집단의 전달에 의해 처리된다. 본원의 개시내용의 특정 구현예에서, 암 또는 감염은 면역 반응을 유발하는 면역 세포 집단의 전달에 의해 처리된다. 본원에 제공된 것은 유효량의 항원 특이적 세포 치료요법을 개체에게 투여함을 포함하는 개체 내 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 방법이다. 본 발명의 방법은 면역 장애, 고형 암, 혈액암 및 바이러스 감염의 치료를 위해 적용될 수 있다.

[0249] 본 발명의 치료 방법이 유용한 종양은 임의의 악성 세포 유형, 예를 들어, 고형 종양 또는 혈액학적 종양에서 발견되는 것들을 포함한다. 예시적인 고형 종양은 췌장, 결장, 맹장, 위, 뇌, 머리, 목, 난소, 신장, 후두, 육종, 폐, 방광, 흑색종, 전립선 및 유방으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 기관의 종양을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 혈액학적 종양은 골수의 종양, T 또는 B 세포 악성 종양, 백혈병, 림프종, 모세포종, 골수종 등을 포함한다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암의 추가의 예는 폐암(소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종을 포함하는), 복막, 위장 또는 위암(위장암 및 위장 기질 암을 포함하는), 췌장암, 자궁암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁암종, 침샘 암종, 콩팥 또는 신장암, 전립선암, 음경암, 갑상선암, 다양한 유형의 두경부암 및 흑색종을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0250] 상기 암은 구체적으로 하기의 조직학적 유형을 가질 수 있지만 이들에 제한되지 않는다: 악성 신생물; 암종; 미분화된 암종; 거대 및 스피들 세포 암종; 소세포 암종; 유두 암종; 편평 세포 암종; 림프구상피 암종; 기저 세포 암종; 섬유모세포 암종; 이행 세포 암종; 유두 이행 암종; 선암종; 악성 가스트린종; 담관 암종; 간세포 암종; 조합된 간세포 암종 및 담관암종; 섬유주 선암종; 선암종; 선종폴립 내 선암종; 가족성 폴립증 콜리 선암종; 고형 암종; 악성 카시노이드 종양; 세기관지-폐포 선암종; 유두 선암종; 색소형성 암종; 호산성 암종; 호산소성 선암종(oxyphilic adenocarcinoma); 호염기성 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포성 선암종; 유두 및 여포성 선암종; 비캡슐화 경화 암종; 부신피질 암종; 자궁내막 암종; 피부 부속 암종 (skin appendage carcinoma); 아포크린 선암종(apocrine adenocarcinoma); 피지 선암종; 귀지 선암종(ceruminous adenocarcinoma); 점막상피 암종; 낭선암종; 유두 낭선암종; 유두 장액성 낭선암종(papillary serous cystadenocarcinoma); 점소양 낭선암종; 점소양 선암종; 시그넷 환 세포 암종(signet ring cell carcinoma); 침윤 도관 암종(infiltrating duct carcinoma); 수질 암종; 소엽 암종; 염증성 암종; 유방 파게트 질환 (paget's disease, mammary); 소포 세포 암종; 선편평세포 암종; 선암종 w/편평 상피화생; 악성 흉선종 thymoma; 악성 난소 기질 종양(ovarian stromal tumor, malignant); 악성 포막종(thecoma, malignant); 악성 과립막 세포 종양(granulosa cell tumor, malignant); 악성 암성모세포종; 세르톨리 세포 암종(sertoli cell carcinoma); 악성 라이디히 세포 종양(leydig cell tumor, malignant); 악성 지질 세포 종양; 악성 부신결정종(paraganglioma, malignant); 악성 유선의 부신결정종(extra-mammary paraganglioma, malignant); 크롬친화세포종(pheochromocytoma); 사구체혈관육종(glomangiosarcoma); 악성 흑색종; 무색소성 흑색종; 표재 확장성 흑색종; 흑색점 악성 흑색종(lentigo malignant melanoma); 선단 흑자성 흑색종(acral lentiginous melanomas); 결절성 흑색종; 거대 색소성모반에서 악성 흑색종; 상피모양 세포 흑색종; 악성 청색모반(blue nevus, malignant); 육종; 섬유육종; 악성 섬유 조직구종; 점액육종(myxosarcoma); 지방육종; 평활근육종(leiomyosarcoma); 횡문근육종; 배아 횡문근육종; 폐포 횡문근육종; 기질 육종; 악성 혼합 종양; 물리관 혼합 종양; 신아세포종(nephroblastoma); 간아세포종(hepatoblastoma); 암육종; 악성 중간엽종; 악성 브레너 종양(brenner tumor, malignant); 악성 엽상 종양(phyllodes tumor, malignant); 활액 육종; 악성 중피종(mesothelioma, malignant); 미분화배세포종(dysgerminoma); 배아 암종(embryonal carcinoma); 악성 기형종(teratoma, malignant); 악성 난소갑상선종(struma ovarii, malignant); 융모암종; 악성 중신종(mesonephroma, malignant); 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종; 악성 혈관주위세포종(hemangiopericytoma, malignant); 림프관 육종; 골육종; 피질주위 골육종(juxtacortical osteosarcoma); 연골육종; 악성 연골모세포종; 간엽성 연골육종(mesenchymal chondrosarcoma); 골의 거대 세포 종양; 어빙 육종(ewing's sarcoma); 악성 치원성 종양

(odontogenic tumor, malignant); 에나멜아세포 치원서육종(ameloblastic odontosarcoma); 악성 에나멜아세포 종(ameloblastoma, malignant); 사기질모세포섬유육종; 악성 송과체부종양; 척색종; 악성 신경교종; 뇌실막세포 종(ependymoma); 성상세포종; 원형질 성상세포종; 원섬유 성상세포종; 성상모세포종; 교모세포종; 핑지교종; 핑 지교모세포종(oligodendroblastoma); 원시 신경외배엽종양; 소뇌 육종; 신경절아세포종(ganglioneuroblastoma); 신경모세포종; 망막모세포종; 후각 신경성 종양; 악성 뇌수막종(meningioma, malignant); 신경섬유육종(neurofibrosarcoma); 악성 신경초종(neurilemmoma, malignant); 악성 과립 세포 종양; 악성 림프종; 호지킨 질환; 호지킨(hodgkin's); 파라옥아종(paragranuloma); 소림프구 악성 림프종(malignant lymphoma, small lymphocytic); 대형 세포 확산 악성 림프종(malignant lymphoma, large cell, diffuse); 여포성 악성 림프종(malignant lymphoma, follicular); 균상식육종(mycosis fungoides); 다른 특정 비-호지킨 림프종; B-세포 림프종; 저급/여포성 비-호지킨 림프종(NHL); 소림프구(SL) NHL; 중간 등급/여포 NHL; 중간 등급 확산 NHL; 고등급 면역아구성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소 비-절단된 세포 NHL; 벨 크 질환 NHL; 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia); 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병; 림프구 백혈병; 혈장 세포 백혈병; 적백혈병(erythroleukemia); 림프구육종 세포 백혈병; 골수백혈병; 호염기성 백혈병; 호산성 백혈병; 단핵구 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거핵아구 백혈병; 골수 육종; 모발 세포 백혈병; 만성 림프구 백혈병 (CLL); 급성 림프아구성 백혈병 (ALL); 급성 골수 백혈병 (AML); 및 만성 골수아구성 백혈병.

- [0251] 치료학적 적용을 위해 본원에 제공된 세포의 적합성을 결정하기 위해, 세포를 먼저 적합한 동물 모델에서 시험할 수 있다. 하나의 수준에서, 세포는 생존하고 생체내 이들의 표현형을 유지하는 능력에 대해 평가한다. 본원에 제공된 세포는 추가의 관찰을 위해 순응할 수 있는 부위에서, 예를 들어, 콩팥 캡슐하에, 비장으로, 간엽으로 또는 골수로 면역결핍 동물 (예를 들어, NOG 마우스 또는 화학적으로 또는 조사에 의해 면역결핍이 부여된 동물)에게 투여된다. 조직은 몇일 내지 수주 이상까지의 기간 후 수확되고 적혈구와 같은 출발 세포 유형이 여전히 존재하는지를 평가한다. 이것은 검출가능한 표지(예를 들어, 녹색 형광 단백질 또는 β -갈락토시다제)를 갖는 투여된 세포를 제공하거나; 투여된 사람 세포에 특이적인 항상성 마커를 측정함에 의해 수행될 수 있다. 본원에 제공된 세포가 설치류 모델에서 시험되는 경우, 투여된 세포의 존재 및 표현형은 사람-특이적 항체를 사용한 면역조직화학 또는 ELISA에 의해 또는 사람 폴리뉴클레오타이드 서열에 특이적인 증폭을 유발하는 프라이머 및 하이브리드화 조건을 사용한 RT-PCR 분석에 의해 평가될 수 있다. mRNA 또는 단백질 수준에서 유전자 발현을 평가하기 위해 적합한 마커는 본원의 다른 곳에 제공된다.
- [0252] 본원의 개시내용에 방법에 의해 제공된 면역 세포는 혈액학적 장애 및 손상을 치료하기 위한 이들의 능력에 대한 다양한 동물 모델에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 겸상 세포 빈혈 마우스 모델 또는 T/B 세포-결핍 Rag-2 녹아웃 마우스는 특히 본원에 기재된 골수 및 림프구 세포를 시험하기 위해 유용한 동물 모델일 수 있다.
- [0253] 동물 모델에서 목적할 수 있는 기능적 특징 또는 효능을 입증하는 본원의 개시내용의 특정 양상에서 제공된 면역 세포는 또한 이를 필요로 하는 사람 대상체에게 직접적인 투여를 위해 적합할 수 있다. 지혈 목적을 위해, 세포는 순환계에 적당히 근접한 임의의 부위에서 투여될 수 있다. 조혈 세포 또는 이의 전구체는 또한 손상 또는 질환 부위에 전달될 수 있다.
- [0254] 본원 개시내용의 특정 양상에서 제공된 세포는 이를 필요로 하는 임의의 대상체의 치료요법을 위해 사용될 수 있다. 상기 치료요법을 위해 적당할 수 있는 사람 조건은 다양한 빈혈 및 헤모글로불린병증, 및 감소된 수의 조혈 세포를 특징으로 하는 질환(예를 들어, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 호중구감소증, 무과립구증, 그랜즈만 혈소판무력증(Glanzmann's thrombasthenia), 혈소판감소증, 및 후천성 면역 결핍 증후군)을 포함한다. 사람 면역치료요법을 위해, 용량은 일반적으로 약 10^9 내지 10^{12} 세포, 및 전형적으로 약 5×10^9 내지 5×10^{10} 세포이고, 이는 대상체의 체중, 환부 특성 및 중증도 및 투여된 세포의 복제 능력에 따라 조정된다. 치료 방식 및 적당한 용량의 결정을 위한 궁극적인 책임은 담당 의사에게 달려 있다.
- [0255] 치료학적 유효량의 면역 세포는 비경구 투여, 예를 들어, 정맥내, 복막내, 근육내, 흉골하 또는 관절내 주사 또는 주입을 포함하는 다수의 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0256] 입양 세포 치료요법에 사용하기 위한 면역 세포의 치료학적 유효량은 치료받는 대상체에서 목적하는 효과를 성취하는 양이다. 예를 들어, 이것은 진행을 억제하거나 자가면역 또는 동종면역 질환의 퇴행을 유발하기 위해 필요하거나 자가면역 질환, 예를 들어, 통증 및 염증에 의해 유발된 증상을 경감시킬 수 있는 면역 세포의 양일 수 있다. 염증, 예를 들어, 암, 부종 및 승온과 같은 염증과 연관된 증상을 경감시키기 위해 필요한 양일 수 있다. 이것은 또한 이식된 기관의 거부를 감소시키거나 방지하는데 필요한 양일 수 있다.

[0257] 면역 세포 집단은 상기 질환에 맞는 치료 용법, 예를 들어, 질환 상태를 개선하기 위해 1일 내지 수일에 걸쳐 단일 용량 또는 수회 용량 또는 질환 진행을 억제하고 질환 재발을 예방하기 위해 연장된 기간 동안 주기적 용량으로 투여될 수 있다. 제형 중에 사용될 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 질환 또는 장애의 중증도에 의존하고 임상주의 판단 및 각각의 환자의 상황에 따라 결정되어야만 한다. 면역 세포의 치료학적 유효량은 치료받는 대상체, 환부의 중증도 및 유형 및 투여 방식에 의존한다. 일부 구현예에서, 사람 대상체의 치료에 사용될 수 있는 용량은 적어도 3.8×10^4 , 적어도 3.8×10^5 , 적어도 3.8×10^6 , 적어도 3.8×10^7 , 적어도 3.8×10^8 , 적어도 3.8×10^9 , 또는 적어도 3.8×10^{10} 면역 세포/ m^2 의 범위이다. 특정 구현예에서, 사람 대상체의 치료에 사용되는 용량은 약 3.8×10^9 내지 약 3.8×10^{10} 면역 세포/ m^2 의 범위이다. 추가의 구현예에서, 면역 세포의 치료학적 유효량은 체중 kg 당 약 5×10^6 세포 내지 체중 kg 당 약 7.5×10^8 세포, 예를 들어, 체중 kg 당 약 2×10^7 세포 내지 약 5×10^8 세포, 또는 체중 kg 당 약 5×10^7 세포 내지 약 2×10^8 세포로 다양할 수 있다. 면역 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중, 성별 및 생리학적 병태를 기준으로 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 유효량은 시험 관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0258] 면역 세포는 면역 매개된 장애의 치료를 위해 하나 이상의 다른 치료학적 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 조합 치료요법은 하나 이상의 항-미생물 제제(예를 들어, 항생제, 항-바이러스 제제 및 항-진균제), 항-종양 제제(예를 들어, 플루오로우라실, 메토틱렉세이트, 파클리탁셀, 플루다라빈, 에토포시드, 독소루비신, 또는 빈크리스틴), 면역-고갈 제제(예를 들어, 플루다라빈, 에토포시드, 독소루비신, 또는 빈크리스틴), 면역억제제(예를 들어, 아자티오프린, 또는 글루코코르티코이드, 예를 들어, 텍사메타손 또는 프레드니손), 소염제(예를 들어, 글루코코르티코이드, 예를 들어, 하이드로코르티손, 텍사메타손 또는 프레드니손, 또는 비-스테로이드성 소염제, 예를 들어, 아세틸살리실산, 이부프로펜 또는 나프록센 나트륨), 사이토킨(예를 들어, 인터류킨-10 또는 형질전환 성장 인자-베타), 호르몬(예를 들어, 에스트로겐), 또는 백신을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 추가로, 칼시뉴린 억제제(예를 들어, 사이클로스포린 및 타크롤리무스); mTOR 억제제(예를 들어, 라파마이신); 마이코페놀레이트 모페틸, 항체(예를 들어, CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG, 또는 B 세포를 인지하는); 화학치료학적 제제(예를 들어, 메토틱렉세이트, 트레오셀판, 부셀판); 조사; 또는 케모킨, 인터류킨 또는 이들의 억제제(예를 들어, BAFF, IL-2, 항-IL-2R, IL-4, JAK 키나제 억제제)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역억제 또는 관용성 제제가 투여될 수 있다. 상기 추가의 약제학적 제제는 목적하는 효과에 의존하여 면역 세포의 투여 전, 투여 동안에 또는 투여 후 투여될 수 있다. 세포 및 제제는 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 및 동일 부위에 또는 상이한 부위에 투여될 수 있다.

[0259] C. 약제학적 조성물

[0260] 또한 본원에서 면역 세포(예를 들어, T 세포 및 NK 세포) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물 및 제형이 제공된다. 투여는 자가 또는 비-자가일 수 있다. 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포 및 이를 포함하는 조성물은 하나의 대상체로부터 획득될 수 있고 동일한 대상체 또는 상이한 상용성 대상체에 투여될 수 있다. 본원의 개시내용의 면역 세포는 카테터 투여, 전신 주사, 정맥내 주사 또는 비경구 투여를 포함하는, 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 본원 개시내용의 치료학적 조성물을 투여하는 경우, 이것은 일반적으로 유닛 투여 주사가능한 형태(예를 들어, 용액, 현탁액, 에멀전)로 제형화된다.

[0261] 본원에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 및 제형은 동결건조된 제형 또는 수용액 형태로, 하나 이상의 임의의 약제학적으로 허용되는 담체와 목적하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분(예를 들어, 항체 또는 폴리펩타이드)을 혼합함에 의해 제조할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012). 약제학적으로 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 완충액, 예를 들어, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 겔라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이팅 제제, 예를 들어, EDTA; 슈가, 예를 들어, 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 역이온, 예를 들어, 나트륨; 금속 착물(예를 들어, Zn- 단백질 착물); 및/또는 비-이온 계면활성제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜

(PEG). 본원에서 예시적인 약제학적으로 허용되는 담체는 조직 사이의 약물 분산제, 예를 들어, 가용성 중성 - 활성 하이알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어, 사람 가용성 PH-20 하이알루로니다제 당단백질, 예를 들어, rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 sHASEGP, 및 rHuPH20을 포함하는 사용 방법은 미국 특허 공개 공보 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 하나의 양상에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제와 조합된다.

[0262] **V. 실시예**

[0263] 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 당업계의 숙련자라면, 하기의 실시예에 기술된 기법들이 본 발명을 잘 수행하기 위해 본 발명가들에 의해 발견된 기법들을 대표하는 것이기 때문에, 발명의 수행에 대한 바람직한 구현예를 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 알 수 있을 것이다. 그러나, 당업계의 숙련자라면, 본원 개시내용을 고려하여, 개시된 구체적인 구현예에 있어서 본 발명의 취지와 범위를 벗어나지 않으면서 여러가지 변화를 주어도 그와 비슷하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 사실을 알 수 있을 것이다.

[0264] **실시예 1 - 항-CD19 CAR-발현 PSC-유래된 T/NK 세포의 유도**

[0265] 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 만능 줄기 세포를 생성하기 위해, 2개의 별도의 방법을 사용하였다. 하나의 방법에서, 전이유전자-부재 PSC는 1C 세포를 생성하기 위한 레트로바이러스 벡터 (US20160257939; 이의 전문이 본원에 참조로 인용된) 또는 E11 세포를 생성하기 위한 에피솜 벡터를 사용하여 T 세포로부터 유래하였다. 두번째 방법에서, PSC는 조절 프로그래밍 유전자 ETV2/ERG, GATA2, 및 HOXA9를 암호화하는 *PiggyBac* 발현 벡터 (도입된 DOX-유도성 ETV2-GATA2-HOXA9 (EGH) 조절 프로그래밍 유전자를 갖는 가공된 H1 ESC)로 형질감염시켜 A16 세포를 생성하였다. 2개의 방법으로부터의 PSC는 이어서 유전학적으로 변형시켜 FMC63 mAb-유래된 사람 CD19-결합 scFv 도메인, CD28 동시 자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인으로 구성된 제2 세대의 항-사람 CD19 키메라 항원 수용체 (CAR)를 항상성으로 발현하도록 하였다.

[0266] 비-변형되고 CAR-변형된 PSC는 사이토킨-지시된 분화 (1C, E11) 또는 EGH-유도된 프로그래밍 (A16)을 통해 CD34⁺ T/NK 선조체로 분화시켰다(도 1a-b). 단리된 CD34⁺ 선조체는 추가로 아스코르브산 인산마그네슘 (0.25 mM), 니코틴아미드 (2 mM) 및 사이토킨 (SCF, TPO, FLT3L, IL7, IL2)이 보충된 StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies)에서 DLL4/레트로넥틴-코팅된 플레이트 상에서 4주 저산소 배양을 사용하여 CD3⁺ T (1C, E11) 및 CD3-CD56⁺ NK (A16) 세포로 분화시켰다. 병행한 T/NK 배양에서, 미토마이신 C-처리된 다우디(Daudi) 세포 (β2-마이크로글로불린 결핍 HLA 부류 I 음성 CD19+ B 림프구아구성 세포주)는 항원 (CD19)-특이적 CAR 활성화의 공급원으로서 마지막 2주 분화 동안에 첨가하였다. 생성된 T/NK 세포는 다음과 같이 지정하였다: 1C 또는 E11-유래된 T 세포 - T, CAR-T, CAR-T/Ag (다우디 동시 배양); A16-유래된 NK 세포 - NK, CAR-NK, CAR-NK/Ag (다우디 동시 배양).

[0267] 단백질 L 염색을 사용한 유동 세포측정에 의해 분화 단계 전반에 걸친 CAR 발현을 평가하였다. CD3⁺ T 세포는 람다 쉐 마우스 항-사람 CD3 mAb (클론 SP34-2)로 동시 염색하였다. T/NK 세포로의 분화 후, CAR 발현은 상당히 사일런싱되었지만, CAR-양성 T 및 NK 세포는 CAR-특이적 항원(Ag; CD19⁺ 다우디 세포를 사용한 동시-배양)을 사용한 활성화 배양 후 선택적으로 확장될 수 있다.

[0268] PSC-유래된 T (1C) 및 NK (A16) 세포의 세포독성 기능은 루시퍼라제-발현 CD19⁺ 다우디 및 라지 (Raji) 표적 세포를 사용한 시험관내 세포독성 검정에 의해 평가하였다. 표적은 1:1의 비율로 24시간 T/NK 이펙터로 항온처리하고 루시퍼라제 활성화는 일정한-Glo 루시퍼라제 검정 시스템 (Promega)에 의해 배양 용해물에서 정량하였다. 퍼센트 세포독성은 하기 식에 의해 계산하였다: $(1 - (ET/T)) * 100$, 여기서, ET = 이펙터+표적 배양, T = 표적 유입.

[0269] 비-변형된 T/NK 세포는 임의의 검출가능한 활성이 부재이지만, 둘다 CAR-발현 T (1C) 및 NK (A16) 세포는 CD19⁺ 표적에 대해 세포독성을 나타냈다. CAR-의존성 세포독성 활성화는 CD19⁺ 표적 (다우디) 세포 (CAR/Ag 변이체)를 사용한 T/NK 동시 배양 2주 후 상당히 증진되었다(도 3a).

[0270] CAR-T 세포의 세포용해 잠재력은 Incucyte S3 생세포 분석 시스템(Essen Bioscience)을 사용한 실시간 표적 세포 계수에 의해 확인하였다. GFP-발현 CD19⁺ 라지 표적 세포는 1:1의 비율로 비-변형된 및 CAR-형질감염된 PSC

(E11 TiPSC)-유래된 T 세포로 항온처리하였다. GFP⁺ 라지 세포의 시간-경과 이미지화 및 계수는 9시간 동안 수행하였다. 생존하는 (GFP⁺) 라지 세포의 상당한 감소는 유일한 CAR-T 세포와의 배양에서 검출하였다 (도 3b).

[0271] T/NK 분화 2주에 이어서 PSC (E11 TiPSC)-유래된 CD34⁺ HPC로부터의 항-CD3 유도된 T 세포 확장 배양 1주에 의해 생성된 CAR-T 세포는 각각 CAR-유도된 및 항상성 사이토킨 생성을 평가하기 위해 사람 CD19 항원 (CD19⁺ P815)으로 형질감염된 마우스 P815 비만세포종 세포 및 비-형질감염된 P815와 24시간 항온처리하였다. 사이토킨은 LEGENDplex 유동 세포측정 멀티플렉스 사이토킨 검정(BioLegend)을 사용하여 배양 상등액 중에서 측정하였다 (도 4). CAR-T 세포는 IFN γ , TNF α , IL2, IL13 및 GM-CSF의 특이적 CAR-유도된 생성을 입증하였다. PSC-유래된 CAR-T 세포의 세포독성 성질은 또한 항상성 그랜자임 B 분비에 의해 밝혀졌다.

[0272] 생체내 CAR-T 세포의 효능을 시험하기 위해, 8-주령 NSG 마우스에 5×10^4 루시페라제-발현 라지 세포를 복막내(ip) 주사하였다. 다음 날(1일)에, T (1C-유래된) 및 NK (A16-유래된) 세포를 10^7 /마우스의 용량으로 주사(ip)하였다. T/NK 주사는 3일 및 5일째 반복하였다. T/NK 주사 동안에 (1일 내지 5일), 모든 마우스에 추가로 IL2 및 IL15 사이토킨 조합물(둘다 500 ng/마우스)을 주사(ip)하였다. 마우스에서 종양 진행은 2주 마다 생체내 생 발광 이미지화에 의해 모니터링하였다(도 5a). 150 mg/kg InVivo-Glo 루시페린 (Promega)이 주사(ip)된 마취된 마우스는 펄 트리로지(Pearl Trilogy) 생체내 이미지화기(LiCor)를 사용하여 루시페린 주사 후 15분 이내에 분석하였다. PSC-유래된 T (1C) 또는 NK (A16) 세포로 처리된 상이한 마우스 그룹 내 생존률 곡선은 도 5b에 나타낸다.

[0273] 2주째에 검출된 종양은 상당히 억제되었고 평균 마우스 생존율은 CAR-발현 PSC-유래된 T 또는 NK 세포를 사용한 하나의 처리 과정 (2일 간격으로 3회 주사)에 의해 ~2x 연장되었다. 생체내 암용해 잠재력은 CAR-발현 PSC-유래된 T 또는 NK 세포와 항원-양성 종양 세포의 시험관내 사전 동시 배양에 의해 상당히 개선될 수 있다.

[0274] 실시예 2 - 지시된 분화 방법

[0275] CD34⁺ 림프구-조혈 선조체로의 PCS 분화: 실시예 1의 T-세포 유래된 PSC(각각 레트로바이러스 및 에피솜 재프로 그래밍에 의해 말초 혈액 T 세포로부터 유래된 1C 및 E11 TiPSC)는 응집물 현탁 배양을 통해 CD34⁺ 조혈 선조체로 분화시켰다. PSC는 필수 8 (E8) 배지에서 Matrigel™- 또는 비트로넥틴-코팅된 6-웰 플레이트 상에서 피더-부재 조건하에서 유지시켰다. 응집물은 2 μ M CHIR99021 (GSK-3 억제제) 및 5 μ M 블레비스타틴 (미오신-II 억제제)이 보충된 E8 배지에서 ml 당 50만 세포의 밀도로 서브-컨플루언트 PSC (<80% 컨플루언스)로부터 제조하였다. 응집물 형성은 15-20 rpm에서 락커 (rocker) 플랫폼 상에서 연속 진탕 하에 초저 부착 (ULA) 플라스크에서 6시간 배양 동안(모든 후속 배양 단계를 포함하는)에 수행하였다.

[0276] 이전 형성된 세포 응집물을 사용한 배양물은 6시간 및 24시간에 동일한 배지 용적의 첨가로 2 μ M CHIR99021, 50 ng/ml VEGF 및 50 ng/ml FGF2가 보충된 무혈청 조혈 분화 배지 (HDM: 50% IMDM, 50% Hams F12 배지, 100 μ g/ml 폴리비닐 알콜, 100 μ g/ml 재조합 사람 혈청 알부민, 1x 비-필수 아미노산 보충물 (Invitrogen), 0.1x 화학적으로-한정된 지질 보충물(Invitrogen), 125 μ M 아스코르브산 2-포스페이트 마그네슘, 0.25 μ M 리놀레산, 미량 원소 보충물 A (0.3x), B (0.2x) 및 C (0.1x) (Corning), 5 mM 염화나트륨, 100 μ M 모노티오글리세롤, 20 μ M 에탄올아민, 100 ng/ml 헤파린, 및 10 ng/ml IGF1)에 점진적으로 이전시켰다. 2일째, 세포 응집물은 15분동안 침강에 의해 침강시키고, 배지를 흡인 제거하고 배양물은 조혈 중배엽 유도 사이토킨 - 25 ng/ml BMP4, 50 mg/ml VEGF 및 50 ng/ml FGF2이 보충된 HDM으로 이전시켰다. 배양은 매일 완전한 배지 변화와 함께 3일 동안 계속하였다.

[0277] 조혈 CD34⁺ 선조체의 분화 및 확장을 지지하기 위해, 세포 응집물은 조혈 지원 사이토킨 - 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml TPO, 20 ng/ml FLT3L 및 20 ng/ml IL-3이 보충된 HDM으로 추가로 이전시켰다. 배양은 매일 완전한 배지 변화와 함께 3 내지 5일동안 계속하였다. 조혈 전환 공정을 개선시키기 위해, 하기의 증진 성분들을 첨가할 수 있다: IL11 (5-20 ng/ml), 8Br-cAMP (100-300 μ M), 및/또는 VEGF (20-50 ng/ml).

[0278] 부유 개별 세포 또는 작은 클러스터로서 현탁액 중에서 동정된 HPC는 2+3+3-5 일 분화 공정 후 수확하였다 (총 8-10일). HPC는 70 μ m 및 30 μ m 세포 스트레이너 (Corning)를 통해 전체 분화 배양물의 여과에 의해 단리하였다. 원심분리에 의한 여과물로부터 수거된 HPC는 HDM에서 1회 세척하였고 TCDM (T 세포 분화 배지)에 재현탁시켰다. T/NK 잠재력을 갖는 HPC를 집적하기 위해, CD34⁺ HPC 분획물의 단리는 제조업체로부터의 추천에 따라 직

접적인 CD34 마이크로비드 (Myltenyi Biotec)를 사용하여 자기-활성화된 세포 분류 (MACS)에 의해 수행될 수 있다. HPC는 T/NK 분화 배양물에 분주하거나 단리 1시간 이내에 이후 사용을 위해 냉동보존하였다.

[0279] **T/NK 분화 배양물:** T/NK 분화를 위해, 비-조직 배양물 처리된 플라스틱 플레이트는 PBS (각각 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 에서) 중에 희석된 노치 리간드 hDLL4-Fc 키메라 단백질 및 레트로벡틴으로 코팅하였다. 세포 분주 전, 코팅 용액을 흡인 제거하고, 플레이트를 PBS로 1회 세척하고 StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies), GlutaMax (1/100), 아스코르브산 마그네슘 포스페이트 ($250 \mu\text{M}$), 니코틴아미드(2 mM) 및 사이토킨 SCF, TPO, FLT3L 및 IL7 (각각 $50 \text{ ng}/\text{ml}$ 에서)로 이루어진 $0.25 \text{ ml}/\text{cm}^2$ T 세포 분화 배지 (TCDM)를 충전시켰다. PSC-유래된 HPC는 $5000 \text{ 세포}/\text{cm}^2$ 밀도로 분주하고 3일째 동일한 TCDM 배양 용적의 첨가와 이후 격일로 배양 용적 절반을 교환하면서 2주 동안 저산소 ($5\% \text{ O}_2$) CO_2 항온처리기에서 배양하였다. 총 분화된 세포를 약한 재현탁 및 비-접착 세포의 수거에 이어서 PBS-EDTA (0.5 mM)를 사용한 5 내지 10분 처리에 의해 느슨하게 접착된 세포의 수거에 의해 수확하였다. 분화 공정을 계속하고 T/NK 세포의 수율을 개선하기 위해, T 세포 분화 배양을 T/NK 세포의 목적하는 수율이 성취될때까지 $10000 \text{ 세포}/\text{cm}^2$ 밀도로 새롭게 제조된 DLL4/레트로벡틴 플레이트에 재분주함에 의해 반복할 수 있다. T/NK 분화의 효율은 또한 TCDM으로 하기의 증진 성분들을 첨가하여 개선될 수 있다: CHIR99021 ($1-3 \mu\text{M}$), IL2 ($2-10 \text{ ng}/\text{ml}$), IL12 ($10-50 \text{ ng}/\text{ml}$).

[0280] **T 세포 확장 배양:** T 세포 확장을 위해, 비-조직 배양물 처리된 플레이트는 PBS(각각 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로) 중에 희석된 항-CD3 mAb (클론 OKT3), hDLL4-Fc 및 레트로벡틴으로 코팅하였다. 세포 분주 전, 코팅 용액을 흡인 제거하고, 플레이트를 PBS로 1회 세척하고 StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies), Glutamax (1/100), 아스코르브산 마그네슘 포스페이트 ($250 \mu\text{M}$), 니코틴아미드(2 mM) 및 사이토킨 SCF, TPO, FLT3L 및 IL7 (각각 $50 \text{ ng}/\text{ml}$ 에서), 및 IL2, IL15 (각각 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 로)로 이루어진 $0.25 \text{ ml}/\text{cm}^2$ T 세포 확장 배지 (TCEM)를 충전시켰다. IL21 ($5-20 \text{ ng}/\text{ml}$)은 또한 확장을 개선하기 위해 첨가될 수 있다. T/NK 분화 배양물로부터 수확된 세포는 $10000 \text{ 세포}/\text{cm}^2$ 밀도로 분주하고 3일째 동일한 TCEM 배양 용적의 첨가와 이후 격일로 배양 용적 절반을 교환하면서 2주까지 저산소 ($5\% \text{ O}_2$) CO_2 항온처리기에서 배양하였다. 확장된 T 세포는 약한 재현탁 및 비-접착 세포의 수거에 의해 수확하였다.

[0281] 실시예 3 - 지시된 분화 방법의 특징 분석

[0282] PSC는 먼저 WNT-유도된 분화 프라이밍, 중배엽 유도 및 8-10일 동안 HPC 분화의 연속 단계를 통해 현탁액 세포 응집물 배양에서 $\text{CD}34^+$ HPC로 분화시켰다(도 1b). HPC 분획은 여과에 의해 단리하였다. $\text{CD}34^+$ HPC의 어떠한 MAC 분류도 수행하지 않았지만 이것은 임의로 직접적인 $\text{CD}34$ 상자성 비드(Myltenyi Biotec)를 사용하여 수행할 수 있다. HPC는 이어서 2-4주 동안에 T/NK 분화를 위해 사람 DLL4-Fc⁺ 레트로벡틴 코팅된 플레이트에 이전시켰다. T 세포는 추가로 항-CD3 mAb (OKT3 클론) 코팅된 플레이트 상에서 배양 1 내지 2주동안 확장시킬 수 있다.

[0283] T/NK 분화 조건에서 2주 후 PSC (1C TiPSC)-유래된 $\text{CD}34^+$ 세포는 낮은 FSC/SSC 파라미터에 의해 정의된 전형적인 림프구 세포 집단으로 발육하였다 (도 1d, 좌측 도트-플롯). 상기 림프구 집단은 대부분 $\text{CD}3^+$ T 및 $\text{CD}56^+\text{CD}3^-$ NK 세포를 함유하였다(도 1d, 중간 도트-플롯). T 세포 집단은 상당한 비율의 이중 음성 세포 뿐만 아니라 $\text{CD}4^+$ 및 $\text{CD}8^+$ 단일 및 이중 양성 세포를 포함하였다(도 1d, 우측 도트 플롯).

[0284] 각각의 세포 유형의 수율은 세포 유도화의 각각의 단계에서 산출량 대 입력량 절대 세포수의 비율로서 계산하였다. 예를 들어, $1.5 \text{ CD}34^+$ HPC 수율은 평균 1.5 (산출량)에서 $\text{CD}34^+$ HPC가 1 (입력량) PSC로부터 유래할 수 있음을 지적한다. 따라서, 102 T 세포 수율은 102 (산출량) T 세포가 1 (입력량) $\text{CD}34^+$ HPC로부터 유래할 수 있음을 지적한다(도 1e).

[0285] PSC (1C TiPSC)-유래된 T 세포 ($\text{CD}3^+$)를 분화시키고 4주동안 확장시키고 α/β TCR (γ/δ 또는 영구 $\text{V}\alpha 24$ NKT TCR이 아닌) 및 전형적인 T 세포 마커 CD5, CD27, 및 CD7을 발현시켰다(도 1f). 이들은 또한 세포독성 T/NK 연합된 (CD161, CD94) 및 활성화 (CD69) 마커를 발현하였다.

[0286] 고정화된 항-CD3 항체(iCD3)는 최소로 요구되었고 PSC-유래된 T 세포의 확장을 성취하는데 충분하다(도 1g, 막

대 그래프). CD3 및 CD28 mAb (sCD3, sCD28)를 사용한 가용성 자극은 단독으로 또는 조합으로 (sCD3⁺sCD28), 또는 iCD3 (iCD3⁺sCD28)에 첨가되는 경우 효과적이지 않았다. 확장 배양물에서 T 세포 증식은 불규칙 형태의 림프 아구의 특징적인 형태를 획득하였다(도 1g, 사진). 상대적으로 이중성 입력량 세포 집단과는 대조적으로, 2주 T 세포 확장으로부터 수확된 세포는 필수적으로 순수한 CD3⁺ T 세포이었고, 이는 또한 CD56을 발현하였고 CD8 발현을 획득하였다(도 1g, 유동 세포측정 도트 플롯). 따라서, 지시된 분화 방법은 효율적으로 T 세포를 생성하였다.

[0287] * * *

[0288] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법들은 본원의 개시내용을 고려하여 과도한 실험없이 만들어 수행할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구현예의 관점에서 기술되었지만, 본 발명의 당업계의 취지, 의미 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화들을 본원에 기술된 방법들, 상기 방법의 단계들 또는 상기 방법 단계들의 순서에 적용할 수 있다는 사실은 당업계의 숙련자들에게는 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적 모두 관련되어 있는 특정 제제의 경우 이들을 사용하여도 동일하거나 유사한 결과가 달성된다면 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있음도 명백할 것이다. 당업계의 숙련자들에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 특허청구범위에 정의된 본 발명의 의미, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.

[0289] 참고문헌

[0290] 하기의 참고문헌들은, 본원에 기술된 내용에 대하여 예시적인 절차이거나 이를 보충하는 기타 상세한 설명을 제공하는 정도로, 본원에 참고로서 구체적으로 인용된다.

- Akkina *et al.*, *J. Virol.*, 70:2581-2585, 1996.
 Alexander *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5092-5096, 1988.
 Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.
 Biswas *et al.*, *Annals NY Acad. Sci.*, 590:582-583, 1990.
 Biswas, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 29:2228-2233, 1991.
 Blomer *et al.*, *J. Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997.
 Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
 Chen *et al.*, *Nature Methods* 8:424-429, 2011.
 Chothia *et al.*, *EMBO J.* 7:3745, 1988.
 Doulatov *et al.*, *Cell Stem Cell*. 10:120-36, 2012.
 Ercolani *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:15335-15341, 1988.
 Evans, *et al.*, *In: Cancer Principles and Practice of Oncology*, Devita *et al.* (Eds.), Lippincott-Raven, NY, 1054-1087, 1997.
 Fechtmeier *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
 Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
 Frisan *et al.*, *Epstein-Barr Virus Protocols*, Part III, 125-127, 2001
 Furie and Furie, *Cell* 53: 505-518, 1988.
 Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
 International Publication N0. WO 2007/069666
 International Publication No. PCT/US2016/057893
 International Publication No. PCT/US2016/057899
 International Publication No. WO 94/09699
 International Publication No. WO 95/06128
 International Publication No. WO 96/39487
 Jores *et al.*, *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990.
 Kaeppler *et al.*, *Plant Cell Reports* 9: 415-418, 1990.
 Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.

[0291]

- Karin *et al.*, *Cell*, 36:371-379, 1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kim *et al.*, *J. Virol.*, 66:3879-3882, 1992.
- Knust *et al.*, *EMBO J.*, 761-766, 1987.
- Ladi *et al.*, *Nature Immunology*, 7: 338 – 343, 2006.
- Langle-Rouault *et al.*, *J. Virol.*, 72(7):6181-6185, 1998.
- Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003.
- Levitskaya *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12616-12621, 1997.
- Linnemann, C. *et al.* *Nat Med* 21, 81-85, 2015.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Methods*, 3(8):637-46, 2006a.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Nabel *et al.*, *Science*, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):263-267, 1996. Zufferey *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9):871-875,
- Ng, *Nuc. Acid Res.*, 17:601-615, 1989.
- Nicola, *et al.*, *Blood*, 54:614-627, 1979.
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Lab. Press, 2001.
- Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Notta *et al.*, *Science*, 218-221, 2011.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Patent Publication No. EP1507865
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Quitsche *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:9539-9545, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012.
- Reubinoff *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 18:399-404, 2000.

[0292]

- Richards *et al.*, *Cell*, 37:263-272, 1984.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor 1997.
- Suzuki *et al.*, *EMBO J.* 6:1891-1897, 1987.
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 131:861-872, 2007.
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- Thomson and Marshall, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165, 1998.
- Thomson and Odorico, *J. Trends. Biotechnol.*, 18:53-57, 2000.
- Thomson *et al.* *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*, 92:7844-7848, 1995.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- U.S. Patent Application No. 08/464,599
- U.S. Patent Application No. 12/715,136
- U.S. Patent Application No. 61/088,054
- U.S. Patent No. 4,683,202
- U.S. Patent No. 5,030,015
- U.S. Patent No. 5,302,523
- U.S. Patent No. 5,322,783
- U.S. Patent No. 5,384,253
- U.S. Patent No. 5,464,765
- U.S. Patent No. 5,486,359
- U.S. Patent No. 5,538,877
- U.S. Patent No. 5,538,880
- U.S. Patent No. 5,550,318
- U.S. Patent No. 5,556,954
- U.S. Patent No. 5,563,055
- U.S. Patent No. 5,580,859
- U.S. Patent No. 5,589,466
- U.S. Patent No. 5,591,616
- U.S. Patent No. 5,610,042
- U.S. Patent No. 5,656,610
- U.S. Patent No. 5,702,932
- U.S. Patent No. 5,736,524
- U.S. Patent No. 5,780,448

[0293]

U.S. Patent No. 5,789,215
 U.S. Patent No. 5,843,780
 U.S. Patent No. 5,843,780
 U.S. Patent No. 5,928,906
 U.S. Patent No. 5,945,100
 U.S. Patent No. 5,981,274
 U.S. Patent No. 5,994,136
 U.S. Patent No. 5,994,624
 U.S. Patent No. 6,013,516
 U.S. Patent No. 6,200,806
 U.S. Patent No. 6,225,042
 U.S. Patent No. 6,355,479
 U.S. Patent No. 6,362,001
 U.S. Patent No. 6,544,518
 U.S. Patent No. 6,790,662
 U.S. Patent No. 7,029,913
 U.S. Patent No. 8,058,065
 U.S. Patent No. 8,129,187
 U.S. Patent No. 8,268,620
 U.S. Patent No. 8,268,620
 U.S. Patent No. 8,372,642
 U.S. Patent No. 8,741,648
 U.S. Patent Publication No. 20020055144
 U.S. Patent Publication No. 20050260186
 U.S. Patent Publication No. 20060104968
 U.S. Patent Publication No. 20090148425
 U.S. Patent Publication No. 20090246875
 U.S. Patent Publication No. 2010/0210014
 U.S. Patent Publication No. 20120276636
 U.S. Patent Publication No. 2014/0315304
 U.S. Patent Publication No. 20160257939
 Wilson *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 9: 91-105, 2009.
 Wilson *et al.*, *Science*, 244:1344-1346, 1989.
 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

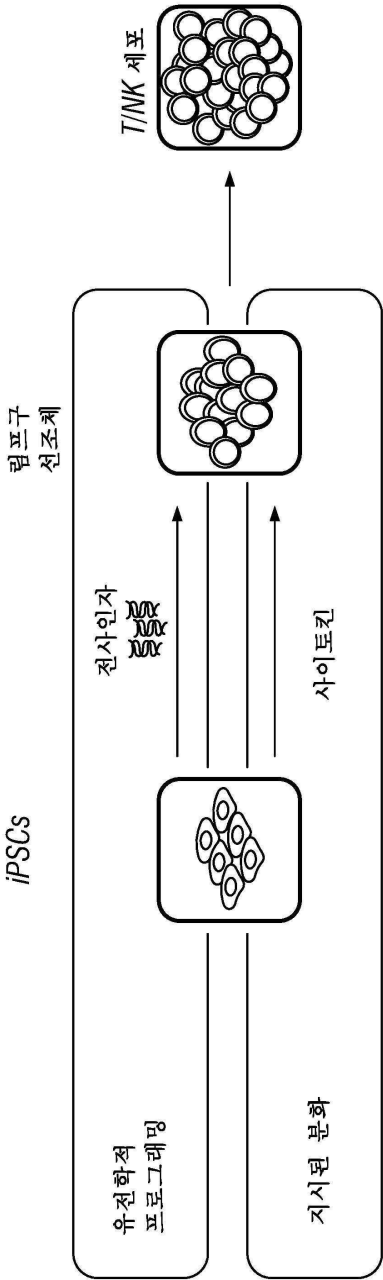
[0294]

Wynn, *Nature Immunology*, 6:1069 – 1070, 2005.
 Xu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 19:971-974, 2001.
 Yamanaka *et al.*, *Cell*, 131(5):861-72, 2007.

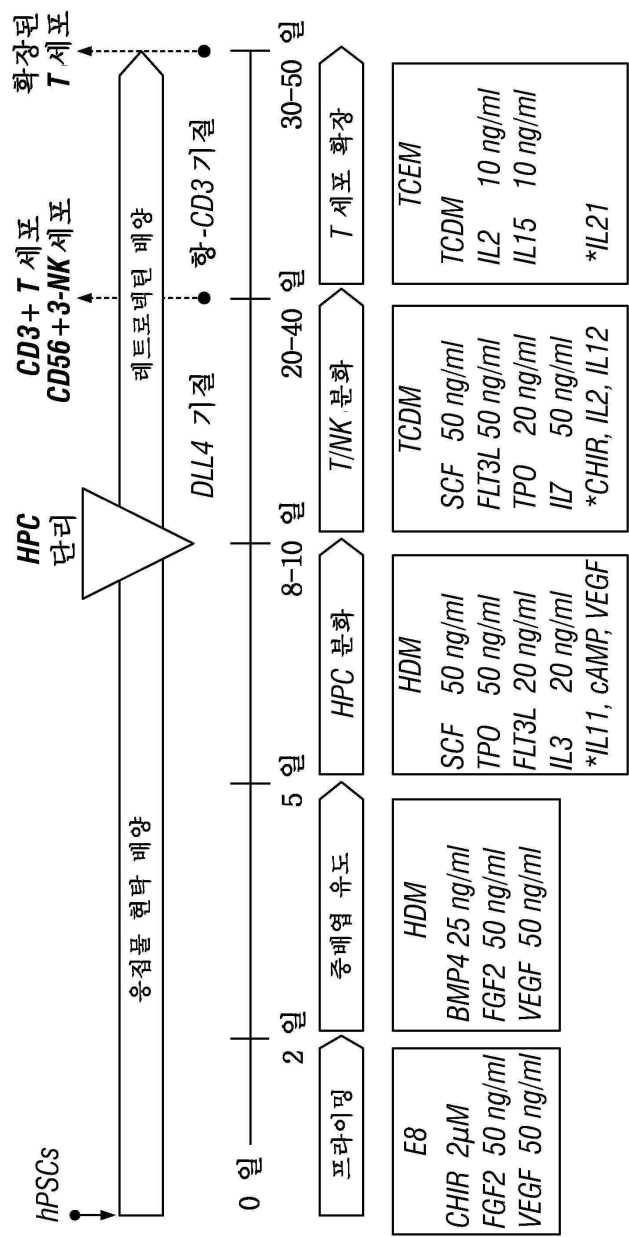
[0295]

도면

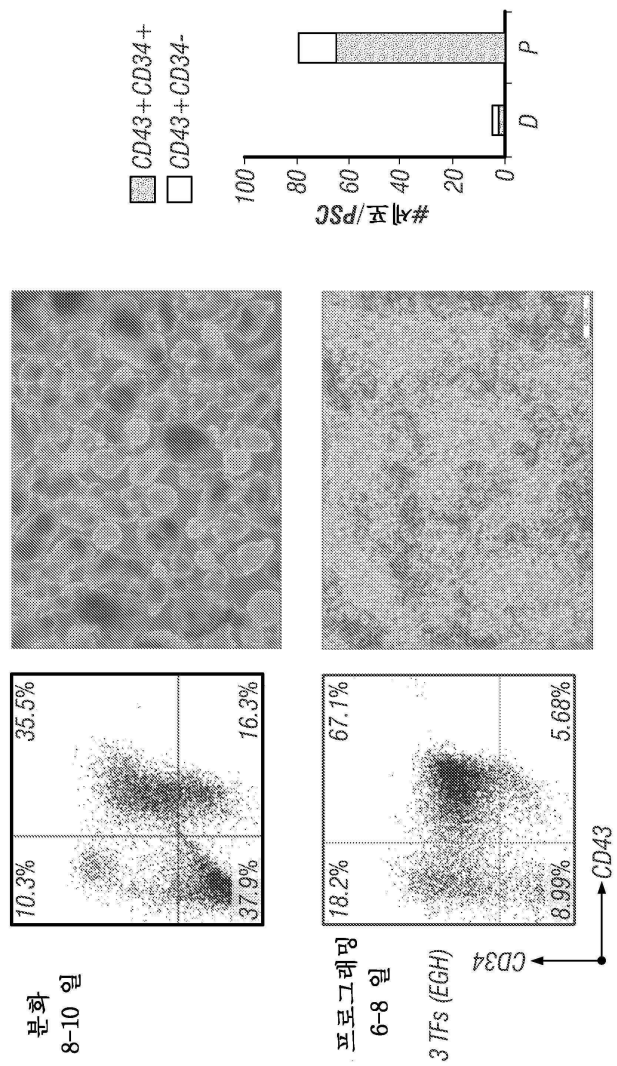
도면1a



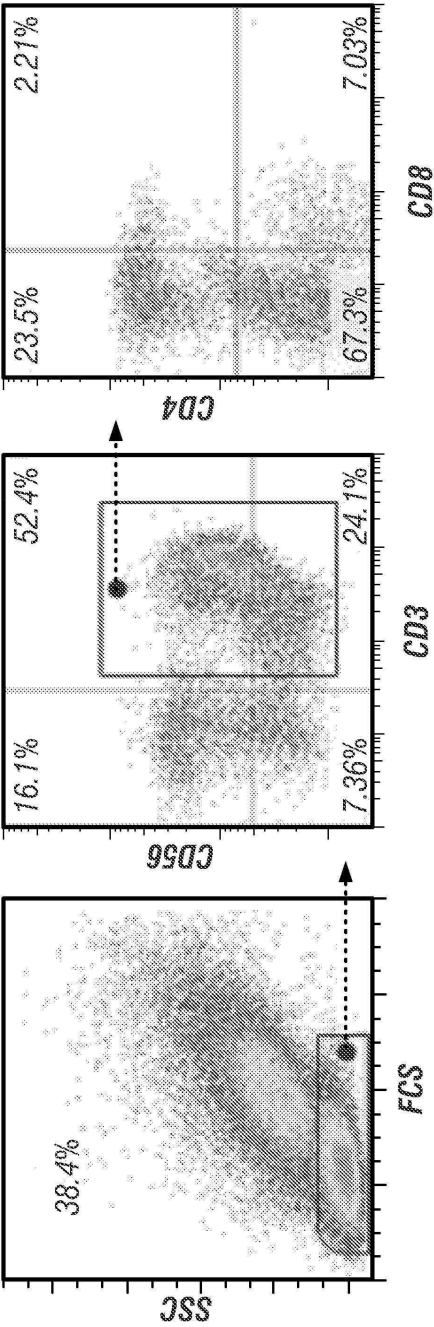
도면1b



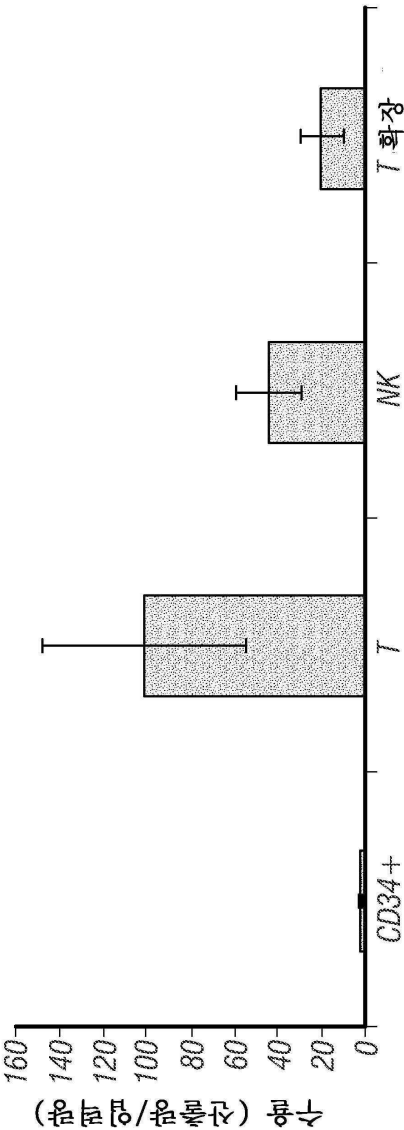
도면1c



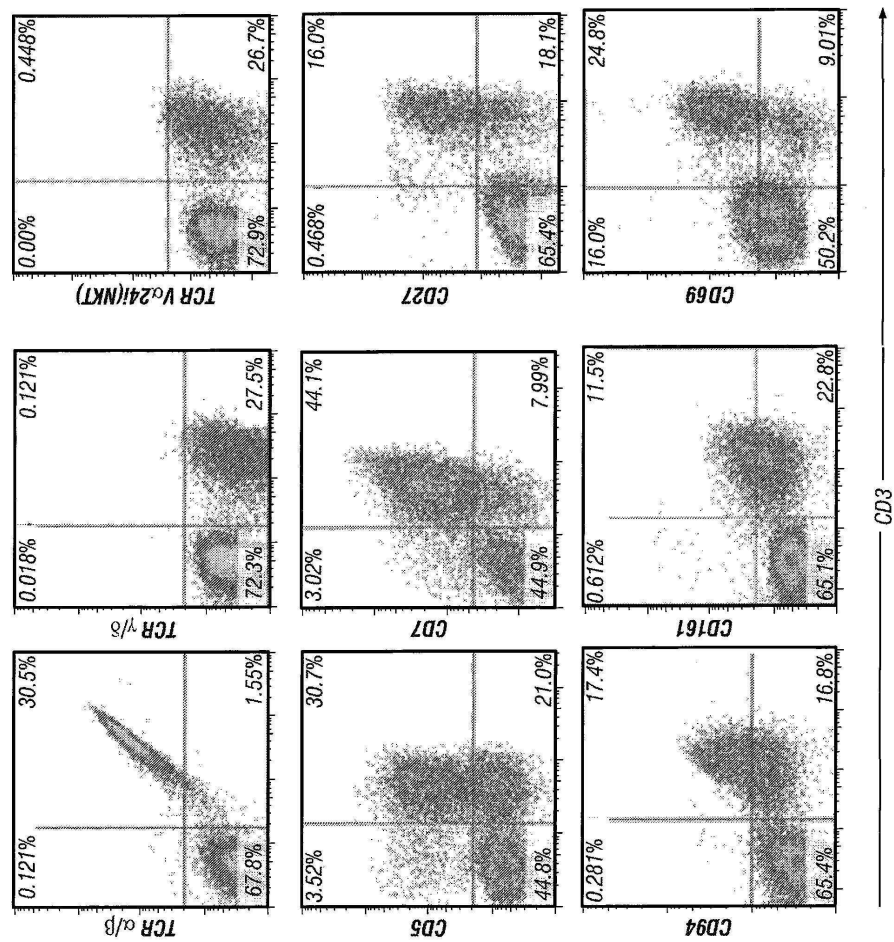
도면1d



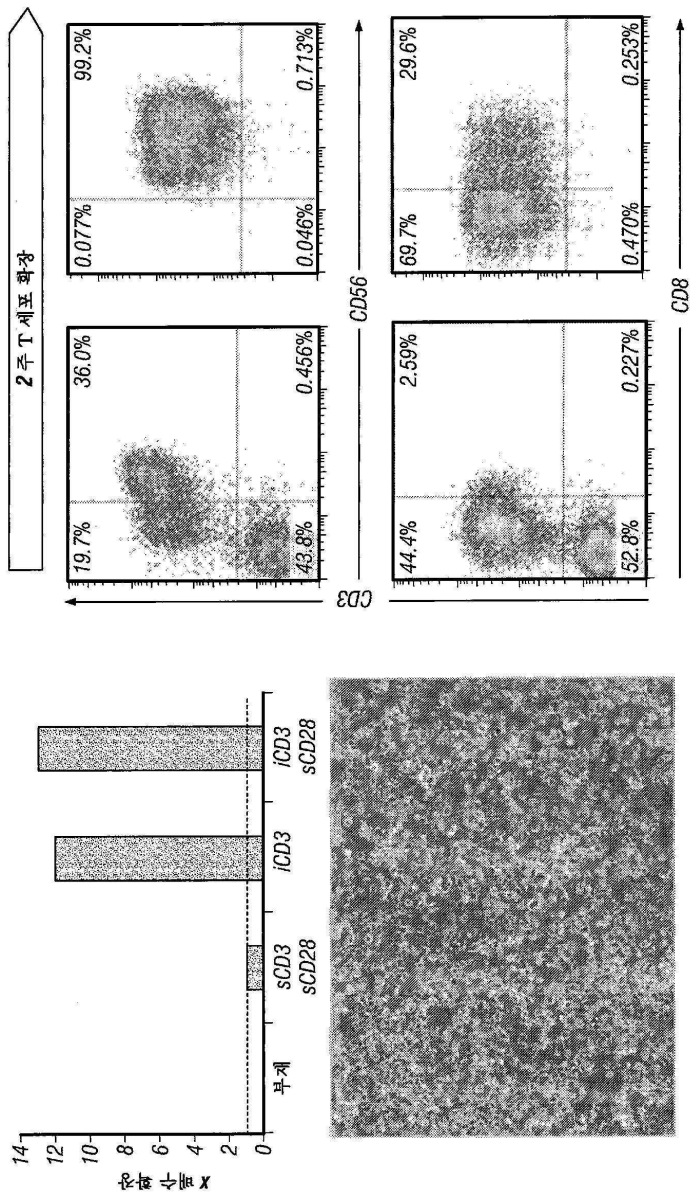
도면1e



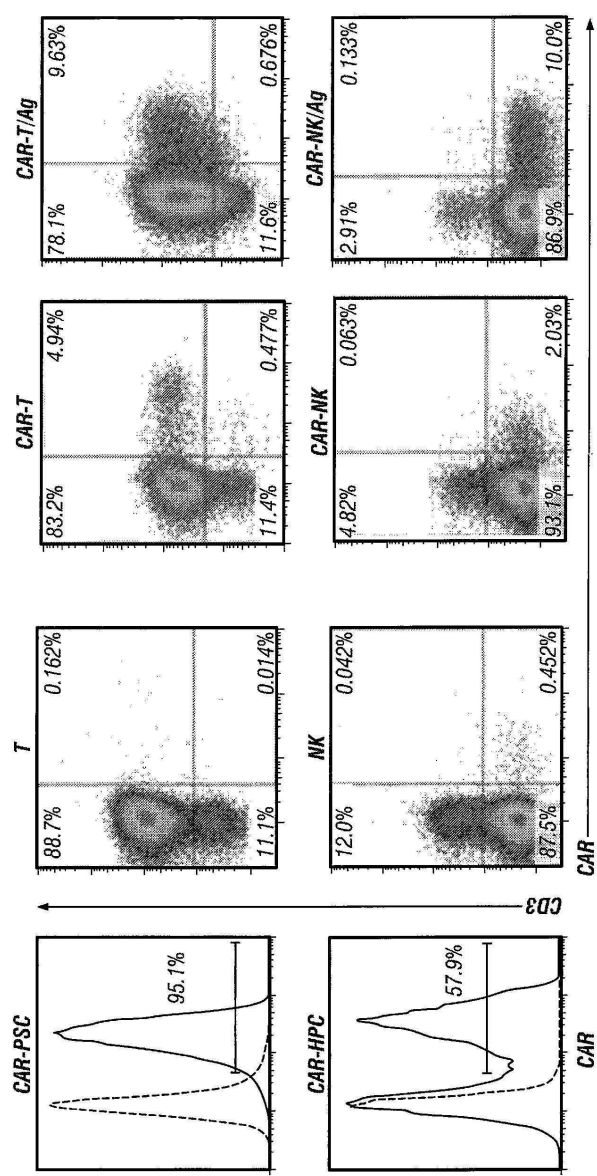
도면1f



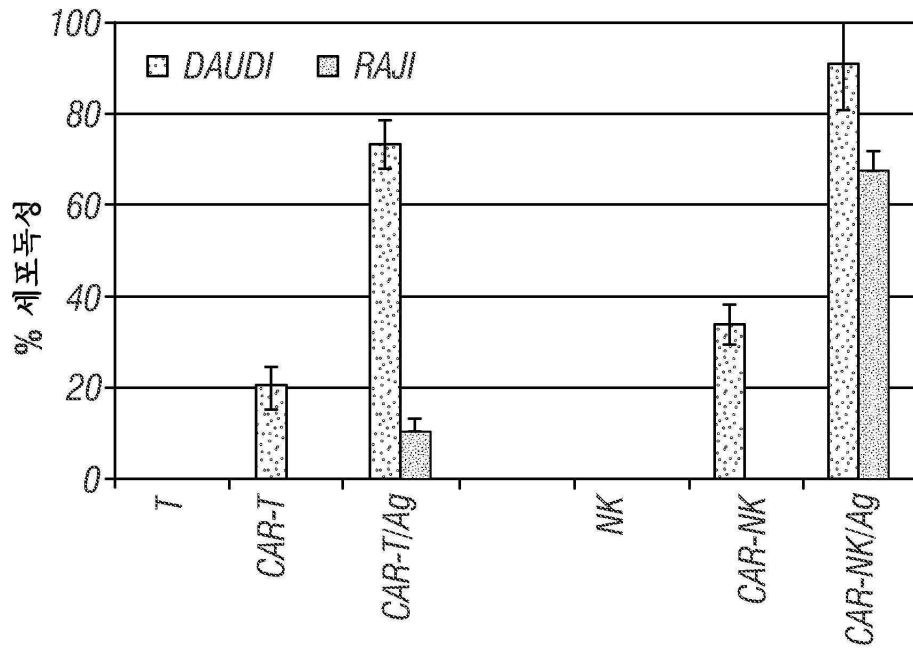
도면1g



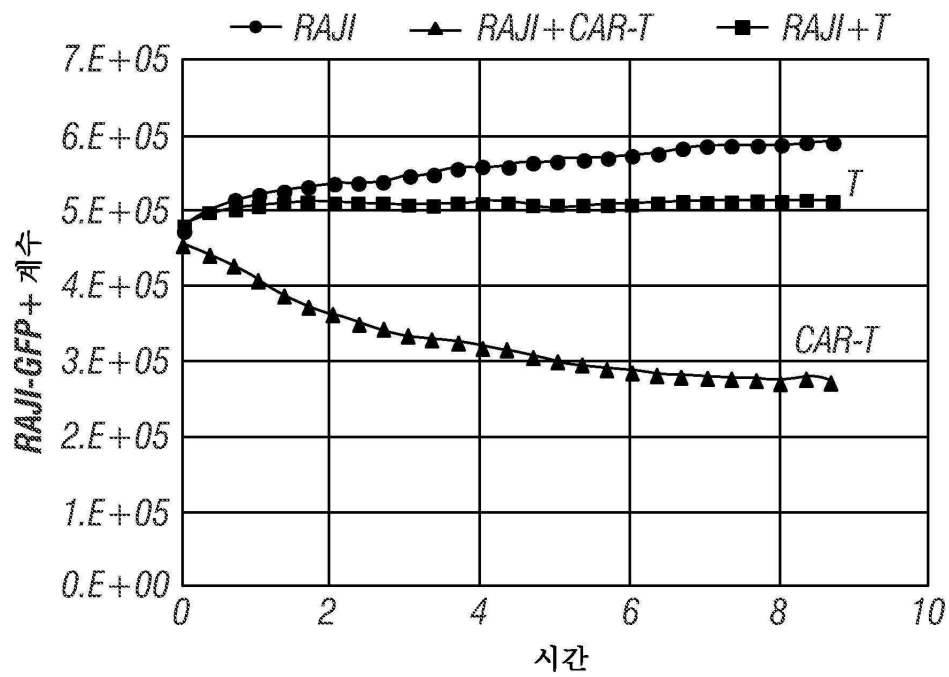
도면2



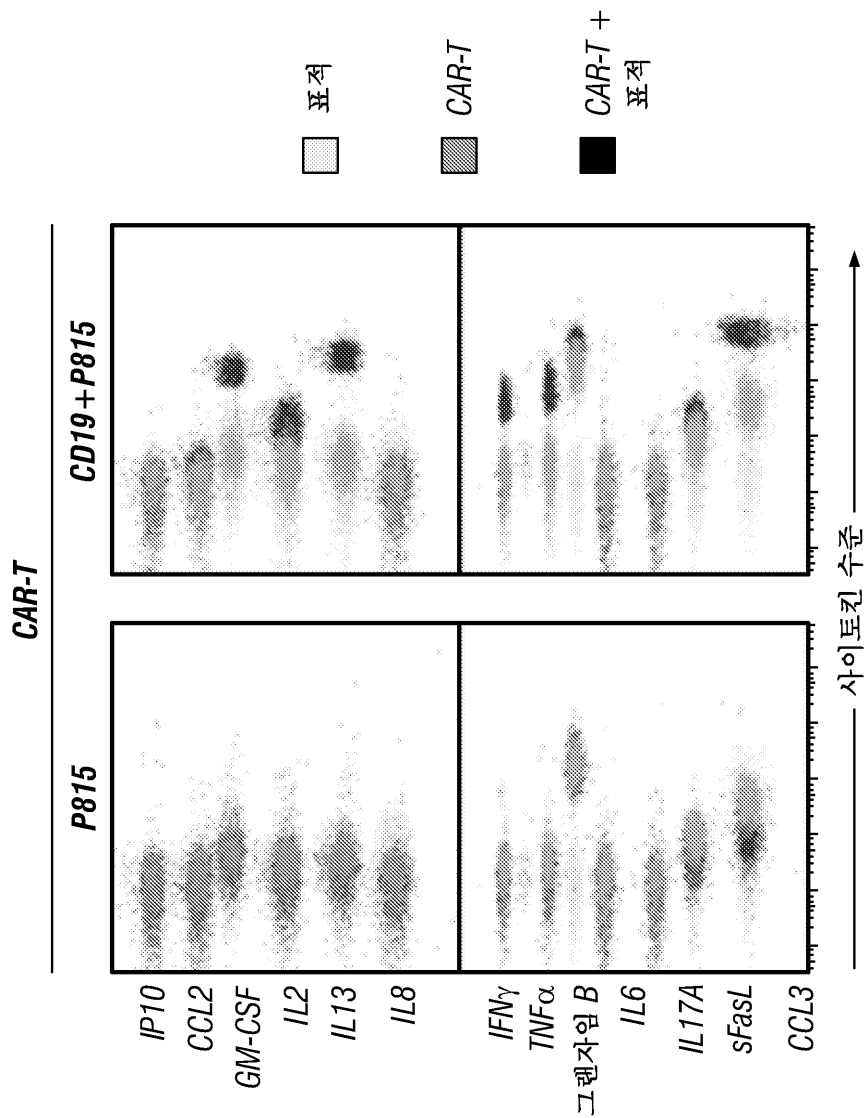
도면3a



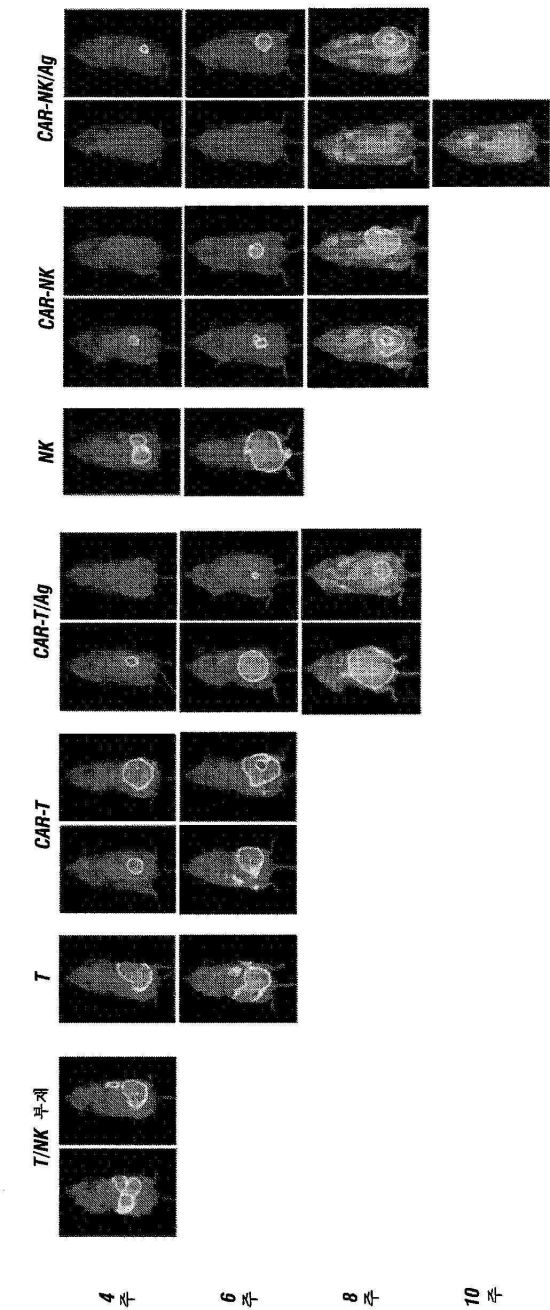
도면3b



도면4



도면5a



도면5b

